



República Federativa do Brasil
Ministério do Desenvolvimento, Indústria
e do Comércio Exterior
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(21) PI 0716157-3 A2



(22) Data de Depósito: 03/09/2007
(43) Data da Publicação: 17/09/2013
(RPI 2228)

(51) Int.Cl.:
A61K 9/50

(54) Título: PROCESSO PARA PRODUÇÃO
MICROCÁPSULAS DOTADAS DE PROPRIEDADES
MAGNÉTICAS, PRODUTO OBTIDO E MÉTODO PARA
A LIBERAÇÃO CONTROLADA DE SUBSTÂNCIAS
ATIVAS

(57) Resumo:

(30) Prioridade Unionista: 05/09/2006 BR PI0603752.6

(73) Titular(es): Centro Brasileiro de Pesquisa Física - CBPF,
Universidade Federal do Rio de Janeiro - UFRJ

(72) Inventor(es): Alexandre Malta Rossi, Marcos Antonio
Morales Torres, Maria Helena Miguez Rocha Leão, Priscilla Vanessa
Finotelli

(74) Procurador(es): Atem e Remer Asses. Consult.
Prop. Int. Ltda

(86) Pedido Internacional: PCT BR2007000224 de
03/09/2007

(87) Publicação Internacional: WO 2008/028264de
13/03/2008

Relatório Descritivo de Patente de Invenção

PROCESSO PARA PRODUÇÃO DE MICROCÁPSULAS DOTADAS DE PROPRIEDADES MAGNÉTICAS, PRODUTO OBTIDO E MÉTODO PARA A LIBERAÇÃO CONTROLADA DE SUBSTÂNCIAS ATIVAS

5

Campo da Invenção

A presente invenção é relacionada a um processo de produção de microcápsulas dotadas de propriedades magnéticas, a produtos relacionados a esse processo e a um método de liberação controlada de substâncias ativas. Mais especificamente, o processo e o produto da presente invenção são úteis na liberação controlada de substâncias ativas como fármacos, catalisadores e outras substâncias ativas. O processo de produção da presente invenção compreende a síntese *in situ* de nanopartículas, na presença de polímeros como alginato e/ou quitosana, incorporando ingredientes com propriedades magnéticas às microcápsulas. O produto obtido por este processo proporciona a liberação controlada de substâncias ativas por aplicação de campo magnético oscilante.

10

15

Antecedentes da Invenção

20

25

A tecnologia de microencapsulação envolve processos complexos que permitem incorporar, a um material ativo, novas propriedades funcionais e “inteligentes”, como a liberação ou atuação controlada em um meio específico ou sob condições apropriadas, tornando-o mais eficaz no material do qual fará parte (alimentos, cosméticos, medicamentos, organismo humano, meios reacionais etc.).

30

Um melhor entendimento das propriedades e efeitos dos biomateriais sobre as propriedades das microcápsulas, durante a fabricação e a interação com o meio onde serão utilizadas, acelerará a transformação da tecnologia de microencapsulação em realidade prática. Isso inclui, entre outras aplicações, a industrial e a clínico-nutricional. Alguns desafios são: que a substância de interesse seja liberada/administrada sob o controle do usuário, sendo que no

caso de medicamentos pode-se optar por: intervalos de tempo tão longo quanto possíveis; que a substância seja dirigida a um compartimento específico do organismo; e que a substância seja protegida até chegar às células alvo dos processos fisiológicos de destruição que encontrará durante o percurso pelo organismo, sendo liberada *in situ* com atividade metabólica (KOST *et al*, 2001).

Tecnologias de liberação de princípios ativos farmacêuticos tais como *transdermal*, *patches*, sistemas nano, sistemas bioadesivos, implantes, sistemas microfabricados, dispositivos de encapsulação de células e sistemas de liberação nasal têm sido consideradas (ORIVE *et al*, 2003). Neste contexto, salienta-se que a tecnologia de liberação controlada de fármacos representa uma das fronteiras da ciência farmacêutica, a qual envolve aspectos multidisciplinares e pode contribuir muito para o avanço da saúde humana. Os sistemas de liberação, freqüentemente chamados de "*drug delivery systems*", oferecem inúmeras vantagens quando comparados a outros de dosagem convencional (KUMAR, 2000), dentre as quais se destacam:

- a) Maior eficácia terapêutica, com liberação progressiva e controlada do fármaco;
- b) Diminuição significativa da toxicidade e maior tempo de permanência na circulação;
- c) Natureza e composição dos veículos variada;
- d) Administração segura (sem reações inflamatórias locais) e conveniente (menor número de doses);
- e) Direcionamento a alvos específicos, sem imobilização significativa das espécies bioativas;
- f) Tanto substâncias hidrofílicas quanto lipofílicas podem ser incorporadas.

A microencapsulação de substâncias ativas apresenta a vantagem de solucionar o problema da instabilidade de materiais ativos e também o de alguns fármacos de uso regular no tempo, como a insulina. Algumas substâncias usadas na clínica médica necessitam de maior controle da taxa de liberação, tendo em vista que atingem um pico máximo logo após a sua administração, geralmente um valor acima do normal no plasma. Nestes casos,

é necessário que as microcápsulas liberem o material do núcleo via estímulo e regulação externos (KOST *et al*, 2001; SIEGEL *et al*, 1995). Estes sistemas, que se assemelham aos processos biológicos nos qual a quantidade do fármaco liberada é função dos requerimentos fisiológicos, são conhecidos como sistemas “*open-loop*” em contraposição a “*closed-loop*”, mas ainda não estão disponíveis comercialmente (SERSHEN *et al*, 2002). Os mecanismos externos de ação estimulante à liberação do núcleo das cápsulas nos sistemas “*open-loop*” são baseados em suas propriedades magnéticas, elétricas e térmicas, ou na ação do ultra-som e da radiação quando aplicados as microcápsulas. A estratégia destes sistemas é a pré-programação pulsada. SIEGEL *et al*, 1995 cita três exemplos de aplicações: hormônios (insulina, de crescimento, etc), que precisam ser liberados endogenamente de maneira pulsada; fármacos que exibem tolerância e não devem ser liberados constantemente (narcóticos e antagonistas, nitrato); e finalmente, quimioterápicos no tratamento de câncer. Microcápsulas moduláveis por campo magnético oscilante contendo insulina podem se ajustar perfeitamente aos requerimentos do organismo, se implantadas em pacientes diabéticos com uma cirurgia invasiva mínima (LANGER, 1990; SIEGEL *et al*, 1995).

Pesquisadores têm investigado sistemas modulados magneticamente para liberação controlada de insulina a partir de matrizes poliméricas, principalmente o copolímero etileno-vinil acetato (EVAc). Pequenas esferas magnéticas são embutidas na matriz polimérica e estas são responsáveis pela resposta ao campo magnético oscilante aplicado externamente, assim ocorrendo a liberação do conteúdo das microcápsulas. Segundo EDELMAN *et al*, 1985, os parâmetros considerados críticos para a regulação da liberação incluem a posição, orientação, e força magnética dos objetos embutidos no polímero e ainda da amplitude e frequência do campo magnético aplicado. Estudos demonstraram que insulina encapsulada em EVAc e implantada subcutaneamente fez decrescer o nível de glicose sangüínea em ratos diabéticos por 105 dias. Nestas condições, houve um decréscimo de até 29,4% do teor de glicose, após aplicação do campo magnético por 11 vezes,

pelo período de 51 dias. Estudos *in vitro* mostraram o efeito do campo magnético sobre a liberação de insulina de microcápsulas de alginato-polilisina contendo micropartículas de ferrita (1 μm) e demonstraram que a liberação de insulina é tanto maior quanto maior a amplitude do campo magnético aplicado (KIKUCHI *et al*, 2002). Assim, sistemas de liberação de insulina controlados magneticamente podem ter uso efetivo como uma glândula artificial. No entanto, um desenho completo do sistema está ainda por ser desenvolvido para aplicações clínicas, sendo esta uma das razões para a continuada pesquisa e desenvolvimento de soluções alternativas como a da presente invenção.

Fatores críticos no controle das taxas de liberação no sistema modulado magneticamente podem ser caracterizados por dois grupos principais: (1) características do campo magnético (frequência e intensidade); (2) propriedades estruturais e mecânicas do sistema da matriz polimérica e as nanopartículas (KOST *et al*, 2001). Outro ponto importante a se tratar são os mecanismos pelos quais estas microcápsulas podem sofrer biodegradação no organismo humano. Se a matriz polimérica não degrada dentro do corpo ela deve ser cirurgicamente removida, implicando em um alto custo e risco para o paciente. Por exemplo, já havia registros no passado de sistemas alternativos para administração de vacinas (PREIS *et al*, 1979). Estes pesquisadores demonstraram que a produção de anticorpos em camundongos imunizados com uma única dose de um antígeno contido numa matriz polimérica não degradável mantinha-se por mais de seis meses, em níveis comparados aos dos camundongos imunizados por duas vezes com o mesmo antígeno. Entretanto, a aplicação desta estratégia suscitou a preocupação sobre os possíveis efeitos adversos que a presença deste material no organismo poderia ocasionar, criando-se, desta forma, a necessidade de remoção cirúrgica do implante após a liberação do antígeno. Neste sentido, a síntese de polímeros biodegradáveis contribuiu para a melhoria destes sistemas, visto que eles não requerem remoção cirúrgica e apresentam poucos efeitos colaterais.

Matrizes poliméricas biodegradáveis já são biocompatíveis e degradáveis, isto é, degradam *in vivo* em fragmentos menores que podem ser excretados pelo corpo. Estes produtos de degradação não são tóxicos, e não devem criar nenhuma resposta inflamatória. Outra característica importante é a
5 degradação ocorrer em um razoável período de tempo, requerido pela aplicação.

O alginato, um hidrocolóide extraído de algas marinhas marrons (*Macrocystis pyrifera*), é um dos mais versáteis biopolímeros usado atualmente nas indústrias de alimentos, farmacêutica e de bioengenharia, tem sido
10 empregado como matriz para aprisionamento de drogas, macromoléculas e células biológicas. O alginato é um copolímero linear composto de ácido β -D-manurônico (M) e ácido α -L-gulurônico (G), sendo estes monômeros arranjados em estrutura de blocos, sendo que a sua composição e distribuição variam com a fonte do alginato. Essa estrutura de blocos determina as
15 propriedades físicas do polissacarídeo e particularmente no tipo de gel formado. O alginato pode sofrer gelificação em presença de sais de cátions divalentes (tais como, Ca^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} , ou Mn^{2+}). A gelificação do alginato é baseada na afinidade do alginato com certos íons e a habilidade de se ligar com estes íons seletiva e cooperativamente. Essa gelificação é
20 convencionalmente descrita em termos do modelo de "egg-box", onde cátions divalentes são ligados coordenadamente aos carboxilatos dos ácidos gulurônicos. A conformação do ácido gulurônico dá a distância adequada dos grupos carboxilas e hidroxilas dando um alto grau de coordenação com os íons cálcio. Alginatos ricos em blocos G formam géis mais fortes, porém quebradiços. Entretanto, alginatos com a predominância de blocos M ou
25 equilibrados (MG) resultam em géis mais fracos, porém elásticos.

O sistema geralmente empregado para a obtenção de esferas de alginato de cálcio consiste no método de extrusão, no qual uma solução de alginato de sódio é gotejada através de uma seringa em uma solução de
30 cloreto de cálcio. A microencapsulação exige a utilização de uma agulha de diâmetro bastante pequeno para a produção de cápsulas em dimensões

micrométricas. Além disso, a substância ativa deve ser misturada à solução de alginato de sódio. No momento em que a gota encontra a solução de cálcio, ocorre o início da troca dos íons sódio pelos íons cálcio na estrutura do alginato (processo de gelificação). O processo difusional dos íons cálcio para o interior da esfera se dá num tempo chamado de tempo de cura e não é uniformemente distribuído, apresentando uma alta concentração da superfície que gradualmente decresce para o centro da esfera. Isso pode ser explicado pela barreira difusional formada logo na superfície da esfera fazendo com que os íons tenham mais resistência ao atravessar para o centro.

Para administração no organismo humano é necessário estabilizar as esferas de gel de alginato em diâmetros menores recobertos com uma membrana funcionando como uma barreira resistente à difusão de moléculas, e evitando o inchamento da esfera por entrada de líquido, redução da permeabilidade. Esferas de alginato têm sido recobertas com polímeros carregados positivamente tais como, poli(metileno-co-guanidina), poli-L-lisina, polietilenamina, e quitosana baseado em interações eletrostáticas.

O alginato apresenta biocompatibilidade, é encontrado em abundância e a baixos preços. A biocompatibilidade bem estabelecida tem permitido ao alginato ser usado industrialmente em aplicações médicas e biotecnológicas (DONATI *et al*, 2003). O alginato por ser hidrofílico não gera tensão superficial com fluido e tecido circundantes, minimizando a adsorção de proteínas e a adesão celular. Por ser um gel leve e flexível, causa reduzida irritação mecânica e friccional em torno do tecido alvo. A combinação destes dois fatores resulta em alta biocompatibilidade. Além, disto, tem um alto grau de permeabilidade para substâncias de baixo peso molecular que geralmente não causam resposta imune, mas que podem causar respostas não específicas no corpo do hospedeiro, que são atribuídas a um super crescimento fibrótico progressivo das microcápsulas, tornando-as ineficazes. Pouco se sabe sobre os efeitos da composição do alginato sobre este fenômeno.

A quitosana é um polissacarídeo constituído de copolímeros de glicosamina e N-acetilglicosamina e pode ser derivado da desacetilação parcial

da quitina proveniente da casca de crustáceos (CANELLA *et al*, 2001). A quitosana pode ser usada para a preparação de vários complexos polieletrólitos com poliânions naturais como carboximetilcelulose, heparina, alginato, carragenana e hialuronato. Complexos quitosana/poliânion têm sido bastante investigado para aplicações em liberação de fármacos e proteínas, transplante de células, imobilização de enzimas. Dentre todos estes complexos, o complexo quitosana/alginato pode ser o mais importante para sistemas de liberação de fármacos. A forte interação eletrostática dos grupos amino da quitosana com os grupos carboxilas do alginato levam a formação do complexo quitosana/alginato (MURATA *et al*, 1999; HUGUET *et al*, 1996). Devido à protonação do grupo amino da quitosana e a ionização do grupo ácido carboxílico do alginato, a estabilidade do complexo quitosana/alginato pode ser influenciada por parâmetros como pH e força iônica.

Nesta última década, pesquisadores em nanotecnologia vêm desenvolvendo alternativas para tornar possível a fabricação, a caracterização e especialmente o aprimoramento de certas propriedades funcionais de nanopartículas para aplicações biomédicas. As nanopartículas são elementos ideais para a construção de dispositivos nanoestruturados com propriedades químicas e físicas ajustáveis. A aplicação de pequenas partículas de óxido de ferro em diagnósticos *in vitro* vem sendo usada há cerca de 40 anos. Pesquisas com vários de tipos de óxido de ferro com dimensões nanométricas, especialmente maghemita e magnetita, vêm aumentando significativamente, sendo a magnetita um candidato promissor devido a sua comprovada biocompatibilidade.

A nucleação das nanopartículas é facilitada pela estrutura conformacionalmente restrita do alginato, assim resultando na agregação do ferro (SREERAM *et al*, 2004). SREERAM *et al*, 2004 conseguiram com que os íons de Fe (III) se ligassem a sítios específicos do alginato e ainda formassem centros espacialmente separados de Fe (III) na estrutura, evitando o recobrimento com precipitados de FeOOH. NESTEROVA *et al*, 2000 sintetizaram clusters superparamagnéticos de complexos de Fe (III) na forma

de ferrihidrita pobremente cristalina na presença de polímeros como polivinil-álcool, poliacrílico e alginato. Eles concluíram que estas partículas de ferro eram superparamagnéticas e que a presença do polímero exerce uma influência significativa na estabilidade e organização dos produtos hidrolíticos de Fe (III) formados.

Os sistemas magnéticos nanoscópicos apresentam uma grande variedade de propriedades físicas interessantes, formando um conjunto único para o estudo de diversos problemas em física do estado sólido, como o superparamagnetismo (MORUP, 1994; GARCIA-OTERO *et al*, 1998; CHIEN, 1991), e a cinética de nucleação e crescimento de grãos (LOPEZ *et al*, 1998).

A completa caracterização dos materiais magnéticos envolve uma série de técnicas experimentais baseadas nas medidas de magnetização, que pode ser definido como sendo a soma de todos os momentos magnéticos elementares da amostra dividida pelo seu volume, e de Susceptibilidade Magnética, que é a grandeza que caracteriza um material magnético segundo sua resposta a um campo magnético aplicado, que pode ser estática (dc) ou dinâmica (ac). Em geral mede-se a magnetização em função do campo magnético aplicado em temperatura constante: são as curvas ou isotermas de magnetização ($M \times H$)_T. A susceptibilidade (em geral ac) em função da temperatura é a outra técnica muito utilizada, por ser simples e não necessitar de campos magnéticos, nos informa como a parte inicial da magnetização varia com a temperatura. Muitas vezes estas técnicas não são suficientes para elucidar o comportamento magnético, principalmente o microscópico, sendo necessárias outras técnicas complementares. Entre elas destacam-se: a ressonância paramagnética eletrônica (RPE), a espectroscopia Mössbauer (EM), calor específico, difração de nêutrons, ressonância magnética, espectroscopia ótica, resistividade, etc.

Compósitos de nanopartículas de óxido de ferro com polímero já foram relatados por diversos autores (CHATTERJEE *et al*, 2002; BERGER *et al*, 2001; FIORINI *et al*, 2002; ZHANG *et al*, 2002; PARDOE *et al*, 2001; QU *et al*, 1999). Em geral, as propriedades magnéticas das nanopartículas são

estudadas usando medidas de magnetometria, espectroscopia Mössbauer (MS) e ressonância paramagnética eletrônica (RPE). CHATTERJEE *et al*, 2002 estudaram nanopartículas de maghemita ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$) recobertas com polietileno; as partículas com diâmetro entre 50-500 nm tiveram uma temperatura de bloqueio de 60 K. BERGER *et al*, 2001 estudaram o comportamento de nanopartículas de maghemita formadas em silicato em função da temperatura via RPE. Eles encontraram que a temperatura de bloqueio das partículas superparamagnéticas foi de 90 K.

FIORINI *et al*, 2002 investigaram as propriedades magnéticas de nanopartículas de maghemita dispersas em álcool polivinílico usando susceptibilidade e espectroscopia Mössbauer. Os resultados indicaram que as interações entre as partículas e o efeito de superfície controlam as propriedades magnéticas. PARDOE *et al*, 2001 usaram a magnetização e a espectroscopia Mössbauer para investigar as propriedades magnéticas das partículas de magnetita e de maghemita sintetizadas na presença de dextran ou de álcool polivinil. Eles verificaram que a temperatura de bloqueio superparamagnético depende da natureza do polímero.

A magnetita (Fe_3O_4) é um dos minérios mais empregados para a obtenção de ferro. Esse minério é um óxido de ferro misto com FeO e Fe_2O_3 apresentando estrutura de espinélio invertida, com os íons O^{2-} de empacotamento cúbico, os íons maiores Fe^{2+} (raio iônico de 0,74 Å) nos interstícios octaédricos, a metade dos íons Fe^{3+} (raio iônico de 0,64 Å) em sítios octaédricos e a metade restante em posições tetraédricas (SIDHU *et al*, 1978). Análises detalhadas revelam que os íons Fe^{3+} são divididos quase igualmente entre as posições tetraédricas e octaédricas e que assim sendo, não existe momento magnético resultante da presença desses íons. Entretanto, quase todos os íons Fe^{2+} residem nos interstícios das posições octaédricas, e serão estes íons os responsáveis pela magnetização de saturação ou ainda pelo comportamento magnético do material cerâmico. A magnetização do Fe_3O_4 ocorrerá com a presença de campo magnético externo, desaparecendo

quando o campo for retirado, esse efeito é devido a não conservação da orientação magnética dos átomos individuais.

O comportamento magnético das partículas de magnetita é fortemente influenciado pelo tamanho das mesmas, pela forma e pela temperatura de conversão dos precursores. Magnetitas com diferentes proporções de Fe (II) / Fe (III) são formadas dependendo da variação na temperatura (LELIS, 2003). E ainda, diferenças no comportamento magnético são observadas não apenas em materiais semelhantes, provenientes de diferentes rotas de síntese, mas também em materiais que tiveram o mesmo tratamento térmico. De acordo com LELIS, 2003 o equilíbrio termodinâmico é alcançado quando ocorrem alguns rearranjos na rede cristalina, implicando mudanças na direção de magnetização e/ou na distribuição espacial dos íons magnéticos.

Dependendo do tamanho e de sua natureza magnética, essas partículas podem estar no estado superparamagnético. Partículas superparamagnéticas são interessantes, pois não conservam nenhum magnetismo após remoção do campo magnético. Sua eficiência no dispositivo de liberação depende da:

- (a) susceptibilidade magnética para um efetivo enriquecimento magnético;
- (b) dimensões das partículas. Partículas na faixa de 6-15 nm, abaixo do tamanho crítico (<15 nm), apresentam geralmente um monodomínio magnético, isto é, partículas com um estado de magnetização uniforme;
- (c) comportamento superparamagnético;
- (d) fabricação de superfícies químicas específicas para aplicações biomédicas, dentre outras.

Os sistemas magnéticos nanoscópicos apresentam uma grande variedade de propriedades físicas interessantes, formando um conjunto único para o estudo de diversos problemas em física do estado sólido, como o superparamagnetismo, e a cinética de nucleação e crescimento de grãos.

A magnetita é um material muito bem conhecido e sua toxicidade tem demonstrado ser bem baixa, de acordo com ARÍAS *et al*, 2001, (LD50 em ratos: 400 mg/kg), e bem tolerado em humanos. Além disso, partículas de magnetita associadas aos polímeros não demonstram toxicidade em animais.

OKON *et al*, 1994, demonstraram que no caso de partículas de magnetita muito pequenas (superparamagnéticas), a biodegradação pode ocorrer nos lisossomos das células do sistema monócito fagocítico aumentando a quantidade de ferro livre, que finalmente é ligada a transferrina e ferritina. Já as partículas maiores da ordem de 80 nm serão eliminadas principalmente por filtração renal. A magnetita pode ser oxidada resultando em produtos cuja formação irá depender de fatores ambientes, grau de substituição isomórfica, tamanho de partículas etc. Podem ser formadas maghemita, misturas de magnetita-maghemita, magnetita-hematita, ou ainda, diretamente hematita (MURAD e JOHNSTON, 1987). A maghemita ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$) é um outro mineral com forte natureza magnética que apresenta uma estrutura não estequiométrica do espinélio, pois não existem Fe^{3+} suficiente para preenchimento de todos os sítios tetraédricos (A) e octaédricos (B).

O diabetes mellitus é um grupo de disfunções caracterizadas por hiperglicemia, metabolismo alterado de lipídios, carboidratos e proteínas; e um risco aumentado de complicações por doença vascular (GOODMAN & GILMAN, 1996). O valor normal de glicemia se situa, em jejum, entre 80 e 120 mg por 100 mL de sangue - podendo variar um pouco dependendo do método de determinação utilizado. Quando a glicemia ultrapassa 180 mg/100 mL, aparece glicose na urina (glicosúria). Quando a glicemia atinge valores excessivamente altos pode provocar perda de consciência e morte. A homeostase da glicose é dependente da concentração de glicose e insulina no plasma (OWENS *et al*, 2001). A insulina é a base do tratamento de quase todos os pacientes com diabetes mellitus dependentes de insulina e de muitos pacientes com diabetes mellitus não dependentes de insulina.

Quando necessário, a insulina pode ser administrada por via intravenosa ou por via intramuscular. Entretanto, o tratamento em longo prazo baseia-se predominantemente na injeção subcutânea do hormônio. A administração subcutânea de insulina difere da secreção fisiológica da insulina em pelo menos duas importantes modalidades: a cinética não mimetiza a elevação rápida e o declínio normais da secreção de insulina em resposta à ingestão de

nutrientes e a insulina difunde-se dentro da circulação periférica em vez de ser liberada dentro da circulação porta; o efeito preferencial da insulina secretada nos processos metabólicos hepáticos é assim eliminado.

A insulina de ação intermediária foi a escolhida para o desenvolvimento da presente invenção. Esta insulina é obtida pela adição de uma substância que retarda a absorção da proteína, o fenol. A combinação de insulina e de uma substância retardadora, geralmente, resulta na formação de cristais (dímeros) que dão ao líquido uma aparência turva (suspensão). As primeiras moléculas de insulina levam aproximadamente 1 hora e meia para alcançarem a corrente sangüínea. A maior quantidade de moléculas atinge a corrente sangüínea entre a 4^a e a 12^a hora depois de administração e, aproximadamente, depois de 24 horas a dose é totalmente absorvida.

A literatura patentária contempla várias patentes relacionadas à produção de microcápsulas contendo substâncias biologicamente ativas. Algumas delas são citadas aqui como referência:

A patente norte-americana US 6,861,064 é relacionada a um método de encapsulamento de substâncias ativas em um polímero biodegradável (polietilenoglicol). A preparação dessas micro- ou nanopartículas contendo material biologicamente ativo, como proteínas, é realizada utilizando-se pequenas quantidades de solventes orgânicos. As microcápsulas sintetizadas possuem diâmetros menores que 10µm e, preferencialmente, entre 0,5-3 µm.

O pedido internacional de patente WO 04071386 descreve a administração de moléculas biologicamente ativas, em particular composições compreendendo microcápsulas de lipossomos contendo nanopartículas magnéticas e moléculas biologicamente ativas.

O pedido de patente brasileiro PI 0008197-3 é relacionado a microcápsulas para a liberação lenta de fármacos, que são constituídas por um copolímero láctico-co-glicólico, ao qual foi incorporado um plastificante e que contém em seu interior um fármaco de interesse farmacêutico.

Entretanto, ainda há uma demanda até então não suprida por processos capazes de, concomitantemente: (i) proporcionar a síntese de nanopartículas *in*

situ, ou seja, no interior de microcápsulas; (ii) proporcionar a síntese de óxido de ferro em presença de alginato e/ou sistema alginato/quitosana; (iii) proporcionar a liberação controlada de substâncias por aplicação de campo magnético oscilante; (iv) proporcionar o aumento da liberação de substâncias por meio do campo magnético. A presente invenção proporciona tais processos e produtos, superando uma lacuna neste campo técnico.

Sumário da Invenção

É um dos objetos da presente invenção proporcionar um processo para produção de microcápsulas dotadas de propriedades magnéticas.

É outro dos objetos da presente invenção proporcionar microcápsulas contendo nanopartículas para liberação controlada de substâncias ativas.

É outro dos objetos da presente invenção proporcionar um método de liberação controlada de substâncias ativas a partir da aplicação de campo magnético oscilante.

Em um aspecto, o processo de produção da presente invenção proporciona a síntese de nanopartículas no interior das microcápsulas. É, portanto, um outro objeto da presente invenção proporcionar um processo para produção de microcápsulas poliméricas biocompatíveis contendo nanopartículas, no qual a síntese de nanopartículas é realizada no interior das microcápsulas.

É também um objeto da presente invenção o produto polimérico biocompatível contendo nanopartículas para liberação de substâncias biologicamente ativas.

Em um outro aspecto, é provido um sistema modulado magneticamente para liberação controlada de substâncias ativas a partir de matrizes poliméricas, em que as nanopartículas atribuem ao produto propriedades magnéticas.

Em um outro aspecto, no caso da administração no organismo humano, é necessário estabilizar as esferas de gel poliméricas em diâmetros menores recobertos com uma membrana funcionando como uma barreira resistente à

difusão de moléculas e evitando o inchaço da esfera por entrada de líquido pela redução de sua permeabilidade. É, portanto, ainda outro objeto da presente invenção proporcionar o recobrimento de microcápsulas poliméricas biocompatíveis com polissacarídeo a fim de aumentar a estabilidade e resistência do sistema.

Em um aspecto preferencial, a presente invenção proporciona um processo de produção de microcápsulas de alginato contendo nanopartículas de óxido de ferro. Este produto é útil para a liberação de moléculas biologicamente ativas, sendo este material, portanto, ainda outro objeto da presente invenção.

Em outro aspecto preferencial, a presente invenção proporciona um processo de produção de nanopartículas de óxido de ferro no interior de microcápsulas de alginato. As nanopartículas de óxido de ferro conferem ao produto propriedades magnéticas e a liberação de moléculas biologicamente ativas se dá por aplicação de campo magnético oscilante, sendo este material, portanto, ainda outro objeto da presente invenção.

Em ainda outro aspecto preferencial, as microcápsulas de alginato são revestidas com quitosana. A forte interação eletrostática dos grupos amino da quitosana com os grupos carboxilas do alginato levam à formação do complexo quitosana/alginato. Devido à protonação do grupo amino da quitosana e a ionização do grupo ácido carboxílico do alginato, a estabilidade do complexo quitosana/alginato pode ser influenciada por parâmetros como pH e força iônica, sendo este material, ainda outro objeto da presente invenção.

Estes e outros objetos da invenção serão valorizados e melhor compreendidos a partir da descrição detalhada de invenção.

Breve Descrição das Figuras

Figura 1 - Esquema representativo do método de microencapsulação baseado na propriedade de gelificação do alginato em presença cations di e trivalentes, onde 1.1 representa a seringa; 1.2 o alginato; 1.3 a agulha; 1.4 gotas de alginato extrusado através da agulha; e 1.5 o gel de alginato FeCl_3 .

Figura 2 – Formação do sistema alginato/quitosana, onde 2.1 representa o poliânion; 2.2 o policátion; 2.3 o cátion multivalente; 2.4 o Hidrogel “Ionotrópico”; e 2.5 o “Complexo Coacervado” ou Poli-Ion Hidrogel Complexo.

Figura 3 - Esquema dos métodos de formação de dois tipos de gel de alginato. Alginato de cálcio, gel “ionotrópico” e complexo alginato/quitosana, gel complexo poliânion.

Figura 4 – Apresenta a homeostase da glicose. Variação fisiológica da glicemia e da insulina no plasma durante 24 h em indivíduos saudáveis (n=12).

Figura 5 - Curva padrão de insulina em tampão fosfato pH 7,4 a 266 nm. Barra: desvio padrão (duplicata).

Figura 6 - **(a)** Espectro de RPE da amostra A em 300 K e **(b)** Espectro de Mössbauer medido a 4,2 K do compósito magnético de alginato (amostra A: 0,01 mols/L Fe).

Figura 7 - **(a)** Espectro de RPE da amostra B a 300 K e **(b)** Espectro de Mössbauer medido a 300 K do compósito magnético de alginato (amostra B: 0,5 mols/L Fe).

Figura 8 - **(a)** Curvas de RPE para o compósito magnético de alginato (amostra A: 0,01 mols/L Fe) a diferentes temperaturas. **(b)** Dependência da temperatura do campo de ressonância obtido a partir da linha $g = 2,2$.

Figura 9 - Medidas de espectroscopia Mössbauer de compósitos magnéticos de (amostra B: 0,5 mols/L Fe) realizadas a diferentes temperaturas.

Figura 10 - Medidas de susceptibilidade e magnetização dos compósitos magnéticos de alginato (amostra B: 0,5 mols/L Fe), obtidas a temperatura como indicado na figura.

Figura 11 - Padrão de difração de raios-X da amostra B: (•) posições dos picos principais do hidróxido de ferro.

Figura 12 - Difração de raios-X de esferas de alginato contendo nanopartículas de Fe_3O_4 produzidas após gelificação do alginato (amostra C).

Figura 13 - Difração de raios-X de esferas de alginato contendo nanopartículas de Fe_3O_4 produzidas antes da gelificação do alginato (amostra D).

Figura 14 - Medida de ressonância paramagnética eletrônica realizada a 300 K.

Figura 15 - Espectros Mössbauer obtidos a 300 K para a amostra D: **(a)** amostra não lavada, e **(b)** amostra lavada. **(c)** Espectro Mössbauer da amostra C.

Figura 16 - Loops $M(H)$ para a amostra C medidos a 20 K (círculos cheios), e a 300 K (círculos vazios). A linha sólida é um ajuste pela função de Langevin com uma distribuição lognormal de tamanhos de partícula.

Figura 17 - Medidas de susceptibilidade de ZFC da amostra A.

Figura 18 - Medidas de espectroscopia Mössbauer em função da temperatura executadas para a amostra C.

Figura 19 - Área de absorção relativa à espectroscopia Mössbauer (RAA) em função da temperatura.

Figura 20 - Micrografia I de uma esfera de alginato de cálcio contendo nanopartículas magnéticas, amostra C.

Figura 21 - Micrografia II de uma esfera de alginato de cálcio contendo nanopartículas magnéticas, amostra C.

Figura 22 - Micrografia III de uma esfera de alginato de cálcio contendo nanopartículas magnéticas, amostra C.

Figura 23 - Visualização da face externa de uma esfera de alginato de cálcio contendo nanopartículas magnéticas, amostra C.

Figura 24 - Visualização da face interna de uma esfera de alginato de cálcio contendo nanopartículas magnéticas, amostra C.

Figura 25 - Imagem de campo claro obtida por microscopia eletrônica de transmissão para uma esfera de alginato de cálcio contendo nanopartículas magnéticas.

Figura 26 - Imagens obtidas por microscopia eletrônica de transmissão (microanálise por perda de energia de elétrons) de uma esfera de alginato de cálcio contendo nanopartículas magnéticas (a) pontos escuros: ferro; (b) pontos claros: oxigênio.

Figura 27 - Perfil da liberação de insulina a partir de microcápsulas de alginato.

Figura 28 - Perfil da liberação de insulina a partir de microcápsulas de alginato/quitosana.

Figura 29 - Comparação dos perfis de liberação de insulina in vitro das microcápsulas de alginato e de alginato/quitosana. Barra: desvio padrão. Quadrados representam o alginato; e triângulos o alginato/quitosana.

Figura 30 - Comparação dos perfis da liberação de insulina em água destilada a partir de microcápsulas contendo diferentes concentrações de insulina em matriz alginato/quitosana. A1: 56%; A2: 38%; A3: 34%; A4: 26%; A5: 25%.

Figura 31 - Comparação dos perfis da liberação de insulina em solução de CaCl_2 a partir de microcápsulas contendo diferentes concentrações de insulina em matriz alginato/quitosana. B1: 73%; B2: 53%; B3: 38%; B4: 31%; B5: 30%.

Figura 32 - Perfil da liberação de insulina a partir de microcápsulas de alginato/quitosana contendo nanopartículas magnéticas de óxido de ferro. Barra: desvio padrão.

Descrição Detalhada da Invenção

A descrição a seguir fará referência preferencial à situação de um processo de microencapsulação de princípios ativos usados nas ciências farmacêuticas, bem como o produto obtido e suas características e aplicações. Tal descrição é preferencial e não deve ser interpretada como restritiva da presente invenção. A opção pela descrição preferencial de substâncias ativas farmacêuticas deve-se ao fato de que tais substâncias são em geral mais instáveis, sendo, portanto, mais críticas as condições de processamento e de estabilização do produto obtido. Os versados na arte valorizarão, portanto, os ensinamentos aqui apresentados, por prontamente saberem que o processo e o produto da presente invenção podem ser aplicados a diversas outras substâncias ativas, incluindo, mas não se limitando a catalisadores, reativos industriais e/ou bioquímicos, produtos terapêuticos como fármacos, hormônios, vacinas terapêuticas ou profiláticas ou ainda outros produtos cuja liberação controlada em qualquer meio seja desejada pelo usuário.

É feita a seguir referência à descrição de uma concretização preferencial da presente invenção, que consiste de um processo para produção de microcápsulas poliméricas contendo nanopartículas magnéticas para liberação

controlada de substâncias biologicamente ativas. Esta concretização da invenção tem como um dos objetivos associar o uso de polímero natural, empregando a nanotecnologia para incorporar o modulador responsável pela resposta do polímero a um estímulo externo que possa controlar a saída do material ativo encapsulado. Sintetizar partículas de óxido de ferro com dimensões nanométricas e diretamente estruturadas na rede polimérica exibida pelo alginato é um dos maiores obstáculos na técnica, pois uma solução prática não deve simplesmente produzir as partículas e as incorporar ao polímero. O sistema geralmente empregado para a obtenção de esferas de alginato de cálcio consiste no método de extrusão, no qual uma solução de alginato de sódio é gotejada através de uma seringa em uma solução de cloreto de cálcio. A microencapsulação exige a utilização de uma agulha de diâmetro bastante pequeno para a produção de cápsulas em dimensões micrométricas. Além disso, a substância ativa deve ser misturada à solução de alginato de sódio. No momento em que a gota encontra a solução de cálcio, ocorre o início da troca dos íons sódio pelos íons cálcio na estrutura do alginato (processo de gelificação). O processo difusional dos íons cálcio para o interior da esfera se dá num tempo chamado de tempo de cura e não é uniformemente distribuído, apresentando uma alta concentração da superfície que gradualmente decresce para o centro da esfera. Isso pode ser explicado pela barreira difusional formada logo na superfície da esfera fazendo com que os íons tenham mais resistência ao atravessar para o centro.

O processo desta concretização da invenção foi idealizado para produzir microcápsulas de insulina em matriz alginato/quitosana, contendo as nanopartículas magnéticas para implante subcutâneo. A quitosana é agregada à matriz de alginato para aumentar a capacidade de aprisionamento da insulina pelo biomaterial. A interação das partículas magnéticas com o campo magnético oscilante externo aplicado é capaz de promover a saída da insulina aprisionada. No entanto, embora a insulina tenha sido a molécula eleita para ser testada quanto a sua liberação, este sistema trata-se de um modelo que pode ser aplicado para diferentes moléculas. Neste caso específico, o sistema

de liberação controlada de substâncias por aplicação de campo magnético é útil para a utilização de insulina em pacientes com diabetes mellitus. Convém salientar que a presente invenção proporciona diversas outras aplicações, como o uso de fármacos para pacientes com distúrbios rítmicos do coração, inibidores de ácido gástrico para controle de úlcera, nitrato para pessoas com angina pectoris, assim como beta bloqueador seletivo, controle de natalidade e reposição hormonal, quimioterapia, e imunossuppressores utilizados a longo prazo.

A presença de íons cálcio na solução de quitosana durante a incubação tem um importante efeito na habilidade da esfera de alginato se ligar a quitosana. A estabilidade do complexo quitosana/alginato é aumentada pela presença dos íons cálcio, pois, apesar da quitosana rapidamente se ligar à superfície da gota de alginato, esta apresenta uma limitada difusão para o interior da esfera. Íons cálcio competem na reação de gelificação e o complexo polieletrólito resulta na formação de um gel mais poroso, permitindo a difusão da quitosana. A estabilidade e a permeabilidade das esferas de alginato/quitosana podem ser melhoradas pelo gotejamento inicialmente da solução de alginato em CaCl_2 para a formação das esferas de alginato de cálcio, e em seguida, as esferas serem tratadas com solução de quitosana para formação de uma membrana do complexo quitosana/alginato (Figuras 2 e 3).

Medidas de espectroscopia de absorção atômica (EAA) foram feitas para determinar a concentração de ferro na amostra. Para isso, utilizou-se um espectrofotômetro equipado com uma lâmpada de cátodo oco e chama ar-acetileno em condição oxidante.

Difração de raios-X (DRX) foi usada para caracterizar a natureza das partículas dos óxidos de ferro formados e determinar o tamanho médio dos cristais. As medidas foram realizadas em um difratômetro de pó operando com radiação de $\text{CuK}\alpha$.

Técnicas de espectroscopia Mössbauer (EM), ressonância paramagnética eletrônica (RPE), magnetização ($M(H)$) e susceptibilidade (χ)

foram usadas para analisar as propriedades magnéticas das nanopartículas de óxido de ferro.

Os espectros Mössbauer (MS) foram obtidos no modo de transmissão usando como fonte ^{57}Co dispersa em matriz de Rh. Para as medidas a baixa temperatura utilizou-se um banho de hélio, com a fonte e o absorvedor mantidos a mesma temperatura. As medidas em altas temperaturas (10 – 300 K) foram realizadas em ciclo fechado em refrigerador em gás hélio, neste caso a fonte foi mantida a 300K. O deslocamento central (center shift – CS) reportado é relativo ao ferro bcc a temperatura ambiente.

A caracterização magnética foi feita usando um magnetômetro. Medidas de susceptibilidade zero-field-cooled (χ_{ZFC}) foram obtidas pelo resfriamento da amostra de 300 K a 4,2 K em campo zero, e a medida do momento magnético da amostra foi feita num campo magnético de 100 Oe.

As medidas de RPE foram feitas a 300 K, com um espectrômetro Bruker ESP 300 equipado com banda X, frequência 9,5 GHz. Algumas medidas foram realizadas de 300 a 5 K. A amostra foi resfriada para reduzir as flutuações do momento magnético para um valor comparável a frequência de medida do equipamento. Como ocorre usualmente a primeira derivada do poder de absorção é dada em função do campo magnético aplicado.

A morfologia das microesferas de alginato de cálcio foi observada em microscópio eletrônico de varredura. A aceleração de voltagem utilizada foi 15 ou 20 kV. As esferas foram fixadas em suportes cilíndricos metálicos com diâmetro de 10 mm usando uma fita adesiva dupla face. As amostras foram subsequentes revestidas com ouro e analisadas.

Para a investigação microestrutural das partículas de óxido de ferro na estrutura do alginato de cálcio foram realizadas micrografias em microscópio eletrônico de transmissão. A amostra foi fixada em glutaraldeído/formaldeído, e posteriormente emblocadas em resina epon. Finalmente, cortes finos foram feitos para a observação no microscópio.

Foi também realizada uma varredura em espectrofotômetro para verificação do comprimento de onda de absorbância máxima para a insulina

utilizada no estudo. Verificou-se que em 266 nm ocorria um pico de absorvência máxima, e a partir de então, estabeleceu-se este comprimento de onda para as análises da insulina. Foi feita uma curva padrão de insulina em tampão fosfato pH 7,4 que forneceu uma equação de reta que posteriormente
5 foi utilizada para cálculos das concentrações de insulina nas amostras. A concentração de insulina nas amostras foi avaliada através de análise espectrofotométrica utilizando o comprimento de onda de 266 nm. Para isso, uma massa de esferas de alginato contendo insulina foi tratada com tampão fosfato pH 7,4 até completa dissolução das mesmas. Para obtenção do tampão
10 fosfato pH 7,4 foi preparada uma solução de KH_2PO_4 0,1 mols/L cujo pH foi ajustado pela adição de solução de NaOH 0,1 mols/L. A eficiência de encapsulação foi calculada utilizando a seguinte fórmula:

Eficiência de Encapsulação (%) = $\{(\text{massa insulina real} / \text{massa de microcápsulas}) / (\text{massa de insulina teórica} / \text{massa de microcápsulas})\} \times 100$.

15 Os resultados foram expressos como a média \pm desvio padrão (DP) de três experimentos. A curva padrão de insulina a 266 nm corresponde a Figura 5 onde se obteve a equação da reta $y = 0,1094 x + 0,0005$ com $R^2 = 0,9983$ para $N = 6$. A equação da reta foi usada para calcular as concentrações de insulina nas amostras.

20 **Exemplo 1 - Síntese *in situ* de Nanopartículas de Óxido de Ferro em Matriz Alginato**

Nesta concretização preferencial, esferas de alginato foram preparadas pelo gotejamento de solução de alginato de sódio 3% em solução de aquosa
25 de cloreto de ferro III. Duas amostras foram preparadas, amostra A com 0,01 mols/L e amostra B com 0,5 mols/L de solução de cloreto de ferro III. O processo esteve sob agitação magnética e atmosfera de argônio à 25°C. As amostras A e B ficaram na solução de ferro III por um período de 5 minutos e 2 horas, respectivamente. As esferas foram então retiradas da solução e lavadas
30 várias vezes com água Milli-Q. A secagem foi realizada em estufa a 35°C por 12 horas.

Exemplo 2 - Síntese *in situ* de Nanopartículas de Óxido de Ferro em Matriz Alginato

Nesta concretização preferencial, na amostra C, as nanopartículas de óxido de ferro foram preparadas na presença de alginato de cálcio. Esferas de alginato de cálcio foram preparadas pelo método de extrusão. A 25°C, uma solução de alginato de sódio 2 % foi gotejada em uma solução de cloreto de cálcio 0,16 mols/L sob agitação magnética. Uma seringa com uma agulha de referência 0,55x20 24 G^{3/4} foi usada como instrumento de produção das esferas. Após a gelificação das esferas que se seguiu por uma hora, as esferas foram removidas da solução de cloreto de cálcio por filtração e lavadas em seguida com solução de metanol 50 %.

Uma solução equimolar de Fe (III) e Fe (II) foi preparada a partir de FeCl₃.6H₂O 0,5 mols/L e FeCl₂ 0,5 mols/L. As esferas de alginato de cálcio foram então adicionadas a essa solução e mantidas a temperatura constante de 60°C por 15 minutos sob agitação magnética. Em seguida, solução de hidróxido de amônio 25 % foi gotejada na mistura ferro-polímero para se obter um pH entre 11 e 12, enquanto a mistura era mantida por 60°C por outros 15 minutos ainda sob agitação magnética. As esferas contendo nanopartículas de óxido de ferro foram lavadas com solução de metanol 50 % e secadas em estufa a 35°C durante 24 horas.

Na amostra D, as nanopartículas de óxido de ferro foram preparadas previamente na ausência de alginato de cálcio. Para isso, uma solução equimolar de Fe (III) e Fe (II) foi preparada a partir de FeCl₃.6H₂O 0,5 M e FeCl₂ 0,5 M e mantida a temperatura constante de 60°C por 15 minutos sob agitação magnética. Em seguida, gotejou-se solução de hidróxido de amônio 25% para se obter um pH entre 11 e 12, enquanto a mistura era mantida por 60°C por outros 15 minutos ainda sob agitação magnética. O pó formado de nanopartículas de óxido de ferro foi separado da solução de ferro e incorporado à solução de alginato de sódio 2 %.

Na síntese do óxido de ferro foi adicionada solução aquosa de NH_4OH à solução contendo os íons ferro para que ocorra uma reação de hidrólise e subsequente condensação das espécies hidratadas. Em seguida, ocorre à formação de uma fase dispersa formando um colóide, resultando em uma suspensão preta. Método conhecido como co-precipitação.

A solução de alginato de sódio 2% contendo as nanopartículas de óxido de ferro foi então gotejada em uma solução de cloreto de cálcio 0,16 mols/L. As esferas de alginato de cálcio foram preparadas a 25°C e sob agitação magnética. Após a gelificação das esferas que se seguiu por uma hora, as esferas foram removidas da solução de cloreto de cálcio e lavadas com solução de metanol 50 % e secadas em estufa a 35°C por 24 horas.

Exemplo 3 - Caracterização das Nanopartículas de Óxido de Ferro em Matriz Alginato do Exemplo 1

Nesta concretização preferencial, a medida de RPE em 300 K pode ser observada na Figura 6a, o espectro é constituído por linhas de ressonância em $g \approx 4,23$ e em $g \approx 2,22$, com as larguras de linha pico a pico (ΔH) ≈ 157 e ≈ 1120 Oe, respectivamente. Espectros similares foram observados em diversos estudos por RPE de matrizes não cristalinas tais como os vidros de borato, de fosfato e de silicato contendo impurezas de Fe^{3+} (KLIAVA, 1986; CASTNER et al, 1960). Nestes trabalhos associam-se as linhas em $g \approx 4,0$ a Fe^{3+} isolado e a linha em $g \approx 2,0$ a partículas de óxido de ferro. Da mesma forma, é possível atribuir à linha em $g \approx 4,3$ a íons isolados de Fe^{3+} ligados a sítios da rede do polímero, enquanto a linha em $g \approx 2$ corresponde a complexos de óxido de ferro onde os íons ferro interagem fortemente entre si. A última linha podia ser devido aos complexos de FeOOH que agem como pontes entre pequenas partes do sacarídeo e os precipitados das nanopartículas situados entre as cadeias do polímero.

A Figura 6b apresenta o espectro de Mössbauer da amostra A medida em 4,2 K; pode-se observar um subespectro superparamagnético sobreposto com um componente paramagnético com $\text{IS} = 0.38(1)$ mm/s e $\text{QS} = 0.76(1)$

mm/s. O subespectro superparamagnético (projeção dos pontos para um desdobramento magnético) indica que o momento magnético está relaxando em um tempo de menos de 10^{-8} - 10^{-9} segundos que está relacionado com o tempo de precessão do momento magnético nuclear do ^{57}Fe .

5 A Figura 8a mostra a dependência da temperatura nas medidas de RPE. A linha em $g = 4,3$ aumenta de intensidade entre 300 e 4 K, o que é característico de uma espécie paramagnética (Fe^{3+} isolado), e a linha em $g = 2,2$ se torna mais larga e seus deslocamentos de posição vão para campos magnéticos mais baixos quando a temperatura da amostra decresce. Na Figura 10 8b, observa-se que o campo de ressonância da espécie em $g \approx 2$ diminuiu quando a amostra é resfriada. O comportamento observado para a linha em $g \approx 2$ é tipicamente de partículas superparamagnéticas.

O espectro de RPE da amostra B a temperatura ambiente pode ser visto na Figura 7a; as linhas de ressonância são similares à amostra A, mas com a 15 linha em 2,2 mais larga do que observado na amostra B. Este resultado indica uma maior interação entre os átomos de ferro na amostra B. A Figura 7b mostra que o espectro de Mössbauer adquirido em 300 K é assimétrico: o pico de baixa velocidade que é distintamente mais estreito e que tem um vale mais elevado do que o pico da velocidade elevada. O melhor ajuste para este 20 espectro consiste em dois dubletos com parâmetros hiperfinos diferentes. O dubleto interno (dubleto I) com deslocamento isomérico, $IS = 0,38$ mm/s e desdobramento quadrupolar, $QS = 0,58$ mm/s, pode estar relacionado ao dubleto observado na amostra A em temperatura baixa. Medidas adicionais executadas a temperatura baixa confirmaram esta atribuição. Assim, é razoável 25 atribuir ao subespectro I os íons Fe^{+3} isolados na cadeia do polímero. Este sítio é relacionado ao pico I de RPE em $g = 4,23$. O dubleto exterior (dubleto II) com $IS = 0,38$ mm/s e $QS = 1.02$ mm/s é típico de partículas muito pequenas de polimorfos de FeOOH ; o QS observado está no acordo com o hidróxido óxido de ferro relatado na literatura (LONG, 1987).

30 Na Figura 9 observa-se as medidas de Mössbauer para a amostra B em várias temperaturas. As características principais destes espectros são o

sexteto desdobrado magneticamente em 4,2 K, com um campo magnético hiperfino de aproximadamente 47,4 Tesla (t), $IS = 0.37$ mm/s e $eQV_{zz}/2 = -0,2$ mm/s, em 4,2 K, e um componente paramagnético com os parâmetros hiperfino similares ao dubleto I da amostra A. Com o aumento da temperatura de 4,2 a 70 K, há um colapso gradual do componente magnético para um dubleto. Este comportamento magnético é típico de nanopartículas magnéticas que exibem uma relaxação superparamagnética e indica que a amostra contém partículas com uma distribuição de temperaturas de bloqueio. No intervalo de temperaturas consideradas neste trabalho, o óxido de ferro não apresenta um comportamento antiferromagnético porque o sinal de RPE das partículas superparamagnéticas de ferro é observado em toda a faixa de temperatura (300 - 4 K).

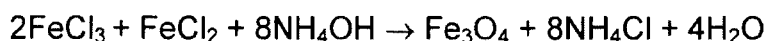
As medidas de susceptibilidade e magnetização são mostradas na Figura 10. Na medida em baixa temperatura com campo zero, a curva mostra um pico com seu centro a temperaturas menores que 4,2 K; deste modo, é possível dizer que a temperatura de bloqueio dos momentos magnéticos é menor que 4,2 K. A curva de magnetização medida a 5 K exibe um regime não saturado até 5 T, indicando que algumas partículas estão bloqueadas já nesta temperatura. Em 300 K, a curva exibe somente um comportamento paramagnético porque todas as nanopartículas magnéticas de ferro estão desbloqueadas e os íons isolados de ferro ligados à estrutura do polímero são paramagnéticos.

A fim de identificar o tipo de óxido de ferro, foram executadas medidas de difração de raios-X (DRX); a Figura 11 mostra os picos muito pequenos e largos com ângulos em 35,1; 39,2; e 55,7; típicos de um sistema que contém cristalitos pequenos. O padrão de DRX é característico de um hidróxido de óxido de ferro, mas não está de acordo com uma fase antiferromagnética tal como uma goethita, que suporta os resultados de MS e de RPE.

Exemplo 4 - Caracterização das Nanopartículas de Óxido de Ferro em Matriz Alginato do Exemplo 2

O DRX das esferas de alginato cujas nanopartículas foram produzidas na presença de alginato de cálcio (amostra C) pode ser visto na Figura 12. Trata-se de um típico DRX de fase mineral cristalina de maghemita ou magnetita, que cristaliza na estrutura espinélio invertida (grupo espacial $Fd\bar{3}m$).

Devido à similaridade dos perfis de DRX do óxido de ferro, é impossível caracterizar o conteúdo relativo a cada uma dessas fases do ferro na amostra C. A magnetita é obtida de acordo com a reação:



A maghemita ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$) é usualmente formada pela oxidação da magnetita. Esse processo de oxidação pode ser parcial quando a amostra é composta por ambos os óxidos de ferro. A Figura 13 apresenta o DRX das esferas de alginato cujas nanopartículas de óxido de ferro foram sintetizadas na ausência de alginato de cálcio (amostra D). O perfil de DRX dessa amostra se mostrou semelhante ao da amostra C (Figura 12).

A largura de linha do DRX da magnetita superparamagnética é causada pela difração dos raios-X sobre os volumes de cristal cujas dimensões são comparáveis ao comprimento de onda dos raios-X. Este efeito pode ser usado para calcular as dimensões do cristal com a fórmula de Scherrer:

$$t = K \lambda / \beta \cos \theta$$

$$\beta = (B^2 - b^2)^{1/2}$$

onde t = tamanho do cristal (nm); K = Fator de Scherrer; λ = comprimento de onda do raio X (nm); β = largura a meia altura do pico de difração (radianos); θ = ângulo de Bragg (radianos); B = largura a meia altura do pico difratado da amostra; e b = a largura a meia altura de um pico do padrão difratométrico numa região próxima ao pico do difratograma. Para as medidas efetuadas, $K = 0,89$ (CULLITY, 1978).

A partir da fórmula de Scherrer, o tamanho do cristal foi estimado em 4,3 e 9,5 nm para a amostra A e a amostra B, respectivamente. Usualmente, nanopartículas de óxido de ferro preparadas pela coprecipitação de sais de Fe^{+2} and Fe^{+3} apresentam diâmetros a redor de 10 nm. Os versados na técnica

saberão que nanopartículas de magnetita (Fe_3O_4) podem ser também sintetizadas usando o método de coprecipitação química de sal de Fe (II) e de Fe (III) com hidróxido de tetrametilamônio ($\text{N}(\text{CH}_3)_4\text{OH}$), em uma solução aquosa que resulta em partículas com diâmetro de 9 nm, com uma estrutura nanocristalina de espécies de óxido de ferro. A diminuição no tamanho da partícula de aproximadamente 50% pode ser explicada pela presença do polímero de alginato de cálcio, cuja conformação estrutural do polímero atuou como scaffold limitando o crescimento das partículas de óxido de ferro.

O espectro de Mössbauer em 300 K, Figura 15a, para o óxido de ferro sintetizado na ausência de alginato de cálcio (a amostra D) mostra picos de um sexteto e um dubleto (perto do centro do espectro), indicativos de um ferro em configuração magnética e paramagnética, respectivamente. Os parâmetros hiperfinos do componente magnético foram: deslocamento isomérico (IS) de 0,36 (7) de mm/s, desdobramento quadrupolar (QS) de 0,72 (1) de mm/s, e campo magnético hiperfino (Hhf) de 55,7 T. O componente paramagnético apresentou IS = 0,37 (7) mm/s e QS = 0,72 (1) mm/s. Com a finalidade de se caracterizar a natureza do componente paramagnético, a amostra foi lavada algumas vezes e um novo espectro de MS foi realizado. Este espectro exibiu somente um componente magnético com parâmetros hiperfinos similar aos da amostra não lavada, conforme mostra a Figura 15b. Estas variações nos espectros de MS podem ser explicadas pela não remoção de partículas com dimensões muito reduzidas de óxido de ferro durante o processo de lavagem. O espectro remanescente poderia ser atribuído a partículas maiores com baixos tempos de relaxação ou a interações magnéticas dos aglomerados de partículas. Devido às interações hidrofóbicas entre as partículas, estas se aglomeram e dão forma a grandes clusters. Estes clusters podem exibir fortes atrações magnéticas do tipo dipolo-dipolo, e dando origem a um comportamento ferromagnético.

A Figura 15c mostra o espectro Mössbauer para a amostra C obtido a 300 K. A amostra apresenta um espectro constituído por um dubleto indicativo de partículas superparamagnéticas de magnetita ou maghemita. Isso é uma

indicação de que as partículas de óxido de ferro têm tamanhos menores que as partículas formadas na ausência do biopolímero. Os parâmetros hiperfinos são $IS = 0,34$ (2) mm/s e $QS = 0,72$ (2) mm/s. Esses parâmetros são similares aos do componente paramagnético da amostra B, amostra não lavada, indicando que as partículas de óxido de ferro possuem a mesma natureza em ambas as amostras. A ausência de desdobramentos magnéticos hiperfinos no componente da amostra A sugere que partículas menores são produzidas quando nanopartículas de óxido de ferro foram sintetizadas na presença de alginato de cálcio.

As medidas do RPE foram executadas a 300 K para a amostra C, para verificar os diferentes sítios do ferro nas esferas de alginato. O espectro (Figura 14) é constituído por uma linha pouco intensa em $g = 4,23$ e uma linha intensa em $g = 2,22$; com larguras de linha de pico a pico de 157 e 1120 Oe, respectivamente. A linha I é característica de um íon paramagnético isolado de Fe^{3+} no sítio estrutural polimérico, provavelmente substituindo os íons Ca^{+2} . Uma linha similar foi encontrada previamente quando se ligou Fe^{+3} à estrutura do alginato. A fração relativa desta espécie é pequena, provavelmente porque os sítios das carboxilas são ocupados majoritariamente por íons Ca^{+2} . Como foi demonstrado anteriormente, a linha II é característica de partículas superparamagnéticas de óxido de ferro de dimensões nanométricas. As análises de DRX das esferas de alginato após o tratamento com a solução do ferro descrita antes, reforçam as conclusões obtidas por RPE.

As medidas de magnetização da amostra C a baixa temperatura e o ajuste sobreposto dos dados experimentais são mostrados na Figura 16. Em 20 K, a magnetização de saturação (M_S), da amostra A, obtida a partir do loop da histerese foi 60 emu/g ou 56 emu/g, dependendo se a amostra contiver magnetita ou maghemita, respectivamente. A relação entre a remanência (M_r) e M_S (M_r/M_S) foi 0,248. Em 300 K, o loop de $M(H)$ mostrou uma coercividade insignificante. O loop foi ajustado por uma função de Langevin com uma distribuição lognormal de tamanhos de partícula. O tamanho médio e o desvio padrão foram 5,8 nm e 3,2 nm, respectivamente.

A Figura 17 exibe a medida de susceptibilidade de ZFC (zero field cooled) para a amostra C. O pico da curva alcança seu valor máximo em 35 K (T_{max}). Sabe-se que em resposta a uma mudança no campo aplicado ou na temperatura, um conjunto de partículas formadas por monodomínios magnéticos e não interagentes aproximarão a um valor de equilíbrio de magnetização com um tempo de relaxação característico. Isto foi derivado primeiramente por Néel: $f = f_0 \exp(-KV/kT)$ onde: f_0 é aproximadamente $10^{10} - 10^{12} \text{ s}^{-1}$, V é o volume das partículas ($V = \pi d^3/6$, d é o diâmetro da partícula), k é a constante de Boltzmann, e K é a constante magnética de anisotropia. Para partículas magnéticas finas o comportamento magnético real depende do tempo de medição (t_m) da técnica experimental específica com respeito ao tempo de relaxação (f^{-1}) associado à superação das barreiras de energia. O tempo de medição (t_m) em medidas de susceptibilidade varia de 10 a 100 s. Se $t_m \approx f^{-1}$, então as partículas estão bloqueadas e T_B ($T_B = KV/k \ln(t_m f_0)$) é dado por $KV/25k$. Usando esta equação pode-se determinar um tamanho para partícula de aproximadamente 5,8 nm, que está de acordo com as medidas de DRX. E supondo que $T_{max} = T_B = 35 \text{ K}$, obtém-se $K = 1,3 \cdot 10^5 \text{ J/m}^3$. Este valor constante de anisotropia é da mesma ordem de valor que o resultado previamente publicado para partículas de óxido de ferro de 6,5 nm de diâmetro (COEY et al, 1997). A relação $M_r/M_s \approx 0.25$ obtida a partir de $M(H)$ a 20 K é menor do que a esperada, de 0,5, para a constante de anisotropia magnética de simetria uniaxial, e partículas de monodomínios não interagentes orientadas aleatoriamente (STONNER et al, 1948). O valor menor de M_r/M_s poderia ser devido a uma fração das nanopartículas que são ainda superparamagnéticas a 20K, assim contribuem ao M_s , mas não ao M_r , conseqüentemente abaixando a relação de M_r/M_s .

Na Figura 18 é possível observar os espectros de Mössbauer da amostra C a diferentes temperaturas (300 a 4 K). Em 300 K, o espectro exibe uma sobreposição de dois componentes que correspondem às partículas de diferentes tamanhos: um dubleto como indicativo de óxido de ferro paramagnético com IS de 0,34 (2) mm/s, QS de 0,72 (2) mm/s, e um

componente largo indicativo de partículas de óxido de ferro lentamente relaxadas com o tempo de relaxação perto do tempo de medição de MS de 10^{-8} – 10^{-9} s, o tempo de precessão nuclear de Larmor. Quando a temperatura diminui, a área relativa do dubleto central diminui, e o componente largo vai dando lugar a um espectro hiperfino. A 4 K, o componente hiperfino, constituído por 6 linhas, domina o espectro. A Figura 19 mostra a dependência da temperatura com a área relativa de absorção (RAA) do componente magnético. Desta figura, a temperatura de bloqueio Mössbauer (T_B^M) foi estimada para ser de aproximadamente 140 K. A T_B^M é definida como a temperatura na qual a RAA do componente ordenado magneticamente iguala ao RAA do componente superparamagnético coexistente (MORUP, 1994). Em 4,2 K, os parâmetros hiperfinos foram $IS = 0,32$ mm/s e $QS = 0,02$ mm/s, e um campo magnético hiperfino médio de 52 T. Este último valor é próximo ao campo magnético hiperfino da magnetita ou maghemita.

Como as outras técnicas usadas neste trabalho, o MS suporta também a idéia que as nanopartículas de óxido de ferro com um comportamento superparamagnético foram produzidas dentro do biopolímero. Devido aos diferentes tempos de medição característicos das técnicas de susceptibilidade e de MS, a temperatura de transição do estado superparamagnético ao estado bloqueado deve ser diferente. Da teoria de Néel da relaxação superparamagnética, o relacionamento entre ambas as temperaturas de bloqueio é como segue: $T_B^M / T_B = \ln(t_m f_o) / \ln(t_M f_o)$, assim se $t_m = 10$ s, $f_o = 10^{11}$ s, e $t_M = 5 \cdot 10^{-9}$ s, então $T_B^M / T_B \approx 4,8$. Este valor é da mesma ordem de valor que encontrado em nossas medidas, $T_B^M / T_B \approx 3,7$, e caem na escala de 6,4 - 3,5 que correspondem ao regime de interação fraca no diagrama de fase magnético relatado por MORUP, 1994.

As esferas de alginato de cálcio contendo nanopartículas de óxido de ferro produzidas pelo Método II A apresentaram uma superfície relativamente lisa macroscopicamente. A forma esférica está associada às ligações cruzadas tangenciais que ocorrem imediatamente a cada gota de alginato de sódio que

entra em contato com a solução de cloreto de cálcio. Enquanto os íons cálcio se difundem através da estrutura interna da esfera, as ligações transversais adicionais estão sendo formadas e estas se conectam com a superfície gelificada, avançando internamente. Observando as micrografias (Figura 20, 21 e 22), verificam-se esferas imperfeitas, com deformidades e superfícies extremamente rugosas.

É sabido que a superfície rugosa de microcápsulas pode provocar maior aceleração na liberação da biomolécula encapsulada do que a superfície lisa, devido à maior área superficial da cápsula. Contudo, o grau de integridade e porosidade das microcápsulas é que indicará a eficiência do polímero como matriz encapsulante. As condições de secagem podem ser responsáveis por deformações na estrutura da esfera, uma vez que se verifica visivelmente a diminuição da esfericidade após a secagem. Tais alterações na morfologia das esferas podem ocorrer durante o processo de secagem. Devido à alta viscosidade do alginato de sódio, a obtenção de esferas pela técnica de gotejamento pode ser crítica. Ao entrar em contato com a solução de cloreto de cálcio, a gota sofre a influência da diferença de tensão superficial podendo formar esferas imperfeitas. Assim sendo, a concentração de alginato de sódio adequada pode ser variar, sendo a faixa de concentração preferível de 1 a 8%, dependendo do peso molecular do alginato.

Analisando mais detalhadamente a superfície da esfera exibida na Figura 22, verifica-se a existência de trincas que são indesejáveis para aplicações cujo objetivo seja reter e proteger biomoléculas. Não foi constatada a presença de macroporos, sugerindo que a concentração de cloreto de cálcio e o tempo de formação das esferas foram suficientes para garantir um suficiente grau de ligações cruzadas do alginato com os íons cálcio. É sabido da literatura que o tamanho dos poros no gel de alginato de cálcio é dependente da concentração de alginato usada na preparação e do tempo de formação da esfera. A porosidade do gel de alginato aumenta com a quantidade de ácidos gulurônicos na cadeia do polímero.

As Figuras 23 e 24 apresentam a morfologia, em MEV, da face externa e interna, respectivamente, da esfera de alginato de cálcio contendo nanopartículas de óxido de ferro. Grânulos cuboidais da ordem de 5 micrômetros são observados em ambas as faces da esfera, e essa característica apresentada pelo interior demonstra que não se trata de uma esfera oca. Essa morfologia irá limitar o crescimento das partículas de óxido de ferro, como demonstrado anteriormente por resultados de DRX e Mössbauer.

As Figuras 25, 26 (a) e 26 (b) apresentam a microestrutura, em MET, da esfera de alginato de cálcio contendo nanopartículas de óxido de ferro. As nanopartículas formadas apresentam-se na forma de aglomerados cristalinos. Os pontos claros dispersos no interior de uma estrutura tipicamente amorfa (alginato), observados na Figura 25 correspondem as nanopartículas de óxido de ferro.

As setas indicam uma partícula de óxido de ferro. As Figuras 26 (a) e (b) destacam-se a distribuição do elemento ferro e oxigênio, respectivamente. Os pontos escuros dispersos no interior de uma estrutura tipicamente amorfa (alginato), observados na Figura 26 (a) correspondem as nanopartículas de óxido de ferro.

Exemplo 5 – Formulação das microcápsulas de insulina em matriz alginato

As microcápsulas de insulina em matriz de alginato foram preparadas em triplicata pelo método de extrusão. Para isso, foram preparados 2 mL de solução de alginato de sódio 3% contendo 10 % em peso de insulina que posteriormente foi gotejada em 10 mL de solução de cloreto de cálcio 2% sob agitação magnética e à temperatura ambiente. Uma seringa de 10 mL com uma agulha 0,55x20 24 G^{3/4} foi usada como instrumento de produção das microcápsulas. Após formação das esferas, estas permaneceram em solução de cloreto de cálcio por 10 minutos, sendo coletadas por filtração e lavadas em seguida com água destilada. As esferas foram pesadas e ainda úmidas foram reservadas para análise. As amostras foram denominadas T1, T2 e T3.

Exemplo 6 - Formulação das microcápsulas de insulina em matriz alginato/quitosana

As microcápsulas de insulina em matriz de alginato/quitosana foram preparadas em triplicata semelhante ao processo de obtenção das microcápsulas em matriz alginato descrito no subitem anterior. As esferas de alginato contendo insulina após serem retiradas da solução de cloreto de cálcio, foram adicionadas a 10 mL de solução de quitosana 3 mg/mL e mantidas sob agitação magnética e à temperatura ambiente por uma hora. A quitosana foi dissolvida em tampão acetato pH 5,0; previamente preparada a partir de acetato de sódio 0,02 mols/L com o pH ajustado pela adição de ácido acético 1%. Para finalizar, as esferas foram coletadas por filtração e pesadas ainda úmidas, sendo reservadas para análise. As amostras foram denominadas TQ1, TQ2 e TQ3.

Exemplo 7 - Aprisionamento de insulina nas microcápsulas em função da concentração de proteína

Com a finalidade de se verificar o comportamento da retenção de insulina pelas microcápsulas, amostras contendo diferentes concentrações de insulina foram produzidas em duplicata. As microcápsulas de insulina em matriz de alginato/quitosana foram preparadas a partir de 2 mL de solução de alginato de sódio 3% contendo quantidades de insulina de acordo com a Tabela 1. O procedimento para a obtenção segue o mesmo apresentado acima. As amostras foram denominadas A1, A2, A3, A4 e A5. A insulina usada na preparação das microcápsulas se apresentava na forma de uma suspensão. Segundo especificações fornecidas pelo fabricante, um mililitro da suspensão de insulina equivale a 100 UI e, de acordo com convenções internacionais, 26 UI correspondem a um miligrama. Logo, a concentração de insulina na suspensão era de 3,85 mg/mL.

Tabela 1 - Massa relativa ao volume de insulina teórico utilizado no processo de obtenção das microcápsulas.

	Volume insulina (mL)	Massa insulina (mg)
A1	0,4	1,54
A2	0,8	3,08
A3	1,2	4,62
A4	1,6	6,16
A5	2,0	7,70

Exemplo 8 - Eficiência de microencapsulação de insulina em matriz alginato

Na etapa de formação das microcápsulas, imediatamente após o gotejamento de alginato de sódio em cloreto de cálcio, inspecionando a esfera formada contra a luz, é possível observar uma membrana circular transparente ao redor da esfera. Essa membrana vai gradualmente desaparecendo, a esfera vai ficando pesada, pois sua densidade aumenta e, finalmente torna-se branca atingindo o fundo da solução de cloreto de cálcio. As microcápsulas formadas usando o método de gelificação externa (método de gotejamento de alginato em solução de cátions divalentes) possuem um grande gradiente de polímero em regiões próximas à superfície da microcápsula. Esse gradiente é formado durante a gelificação, como resultado da difusão dos íons para o interior da esfera e é governado pela taxa de difusão que pode ser afetada pela concentração do polímero, peso molecular do alginato, concentração do íon de gelificação e a presença de outros íons não gelificantes.

Segundo KIM et al, 1992, esferas de 2 mm preparadas a partir de alginato de sódio 2% e de CaCl_2 0,1 mols/L levaram 6 minutos para estabilizarem a concentração de cálcio, ou seja, o tempo necessário para que nestas condições ocorresse a formasse das esferas de alginato. Portanto, baseado neste estudo, estabeleceu-se como tempo de cura 10 minutos, que seriam o suficiente no preparo das microcápsulas de insulina.

Após a encapsulação da insulina, as microcápsulas foram tratadas com tampão fosfato, pois os íons fosfato funcionam como seqüestrantes de cálcio

da estrutura do alginato, fragilizando as esferas, fazendo com que o gel se desfaça. Assim, a insulina é liberada das microcápsulas para análise. Houve a preocupação em manter um pH fisiológico e que proporcionasse uma estabilidade à proteína, sem comprometer a sua atividade. As microcápsulas levaram cerca de 24 h para se dissolverem completamente. Fazendo a analogia do fenômeno de abertura das microcápsulas com o processo de gelificação do alginato, tem-se que ambos envolvem processos de difusão. Assim como os íons cálcio se difundem para o interior da esfera para formar alginato de cálcio, os mesmos íons cálcio vão se difundindo para o exterior da esfera para se ligarem aos íons fosfato. Este processo inverso de “desgelificação” é muito mais lento, mesmo porque a quitosana é fracamente solúvel neste pH, e requer cuidado com agitação para não provocar formação de espuma pela presença da proteína.

Na Tabela 2 é possível observar as massas de microcápsulas obtidas pela preparação em matriz alginato. A massa média foi de $(1,02 \pm 0,16)$ g. Apesar de se tratar do mesmo método com os mesmos parâmetros de formulação, as massas encontradas de microcápsulas apresentaram uma variação considerável devido à dificuldade de reprodutibilidade das condições, tais como pressão no êmbolo da seringa, distância da agulha para a solução de CaCl_2 , velocidade de gotejamento, perda de material nas paredes da seringa etc.

Tabela 2 - Massa de microcápsulas de insulina em matriz alginato obtidas pelo processo de extrusão.

Amostra	Massa microcápsulas (g)
T1	0,8403
T2	1,0661
T3	1,1435

A quantidade de insulina encapsulada por massa de microcápsulas e a relação teórica esperada entre a massa de insulina e a massa de microcápsulas encontram-se na Tabela 3. Desta forma, é possível concluir que

a eficiência de encapsulação, ou seja, o quanto de insulina ficou retida na matriz após o processo de microencapsulação, foi em média 33% e os valores são apresentados na Tabela 4.

- 5 **Tabela 3** - Relação teórica e real entre a massa de insulina e a massa de microcápsulas.

Amostra	mg insulina teórica / g microcápsulas	mg insulina real / g microcápsulas
T1	7,14	2,26
T2	5,63	1,64
T3	5,25	2,06

Tabela 4 - Eficiência do processo de microencapsulação em matriz alginato.

Amostra	Eficiência de microencapsulação (%)
T1	31,6
T2	29,1
T3	39,2
Tmédio	33,3 ± 5,2

- 10 $T \pm DP$

A baixa eficiência de encapsulação pode ser devida a perdas de insulina durante o processo de gelificação, como, por exemplo, a retenção da proteína nas paredes do êmbolo, devido à viscosidade do polissacarídeo. Como a proteína se apresenta na forma de uma suspensão de insulina, sua distribuição na microcápsula se dá aleatoriamente, sendo que a porção que se localiza adsorvida na superfície externa da esfera, está sujeita a se perder nas lavagens durante o procedimento.

- 15

Exemplo 9 – Preparação das microcápsulas de insulina em matriz alginato/quitosana contendo nanopartículas magnéticas para ensaios de liberação

As microcápsulas de insulina foram preparadas em triplicata à temperatura ambiente seguindo o procedimento detalhado no Exemplo 5. Para a nucleação das nanopartículas de óxido de ferro, as microcápsulas foram adicionadas a uma mistura de solução de cloreto de cálcio, usada inicialmente, com soluções de cloreto de ferro II e III (0,5 mols/L), na proporção 1:1:1. Essa mistura foi mantida a 60°C por 10 minutos sob agitação magnética e, posteriormente, solução de hidróxido de amônio 25% foi adicionada para atingir o pH entre 11 e 12, enquanto a mistura era conservada a 60°C sob agitação durante mais 10 minutos. As esferas foram lavadas com água destilada e para finalizar cada réplica foi dividida em duas partes de acordo com a Tabela 5. As amostras foram denominadas L1PM(n), L2PM(n), com n sendo de 1 a 3.

Tabela 5 - Quantidade de microcápsulas em matriz alginato/quitosana contendo nanopartículas magnéticas para ensaios de liberação *in vitro*.

Amostra	Massa microcápsulas (g)
L1PM1	0,1541
L2PM1	0,1342
L1PM2	0,1651
L2PM2	0,2128
L1PM3	0,1645
L2PM3	0,2103

Exemplo 10 - Ensaios de liberação de insulina *in vitro*

Para a realização dos ensaios de liberação de insulina *in vitro* uma quantidade de microcápsulas foi colocada em um tubo Falcon contendo 20 mL de água destilada. Os tubos foram acondicionados à 37°C com uma agitação de 100 rpm em um “shaker” Certomat BS-1 (B. Braun Biotech Intern.). Aliquotas de 4 mL eram retiradas para análise, havendo reposição do mesmo

volume de água, em intervalos determinados. O mesmo ensaio foi realizado colocando as amostras da Tabela 6 em solução de cloreto de cálcio 2% com reposição da mesma solução.

Durante o tempo de estudo de liberação da insulina por difusão (~ 800 horas) não foram observados qualquer fragmento de polímero em solução.

Tabela 6 - Quantidade de insulina em porcentagem presente nas microcápsulas e a massa das mesmas para o ensaio de liberação em solução de cloreto de cálcio 2%.

Amostra	% Insulina	Massa microcápsulas	Massa microcápsulas
		(g) (L1)	(g) (L2)
B1	73	0,2511	0,2846
B2	53	0,3115	0,3566
B3	38	0,3006	0,3204
B4	31	0,2992	0,2756
B5	30	0,3128	0,3905

A liberação *in vitro* de insulina a partir de matriz alginato foi monitorada periodicamente até que sua concentração na solução atingisse um valor constante, o que correspondia ao final do processo de liberação da proteína pelas microcápsulas. (Figura 27). A capacidade total de carregamento das microcápsulas por volume de água usada neste teste foi de 0,034 mg/mL de insulina. Verifica-se que 20 % da insulina é liberada nos primeiros minutos do ensaio, o correspondente à fração de proteína adsorvida na superfície da esfera. Numa segunda etapa, a insulina é liberada de forma mais gradual até atingir quase 50 % da quantidade inicial existente na microcápsula. Essa liberação pode ser atribuída à difusão da proteína através da matriz polimérica e ao desgaste da superfície da esfera (erosão). Após 100 horas de ensaio, a liberação de insulina atinge seu valor máximo e sua concentração se mantém constante até o tempo final do estudo (~ 800 horas).

A insulina das microcápsulas de alginato/quitosana é liberada de maneira mais gradual que a proveniente das microcápsulas de alginato. Neste caso, a capacidade total de carregamento das microcápsulas por volume de água usada também foi de 0,034 mg/mL de insulina. Inicialmente, as esferas se apresentaram mais estáveis com uma liberação menos brusca de insulina. Em 250 horas de ensaio somente cerca de 30 % de insulina havia sido liberada (Figura 28). A partir deste ponto a proteína não foi mais liberada das microcápsulas, mantendo a concentração de insulina em equilíbrio na solução.

Este efeito de liberação brusca observado na liberação da insulina a partir de matriz alginato é frequentemente encontrado em liberação de proteína a partir de hidrogéis formados por matrizes poliméricas incháveis, como é o caso do alginato. A associação do alginato com a quitosana diminuiu este efeito inicial, pois melhora a morfologia da matriz polimérica.

Na Figura 29 é possível observar as duas curvas de liberação cumulativa de insulina relacionada com a porcentagem de insulina total nas microcápsulas. O objetivo inicial foi associar alginato e quitosana para obter um sistema encapsulante que promovesse uma retenção de insulina por um tempo mais prolongado. Verifica-se que no sistema conjugado dos polímeros, a liberação da insulina pelas microcápsulas é reduzida por um fator de 50%. O objetivo então foi alcançado, demonstrando a eficiência da membrana alginato/quitosana como matriz encapsulante. O aprisionamento mais efetivo da proteína pode ser atribuído à interação eletrostática entre os grupos carboxílicos do alginato com os grupamentos aminos da quitosana que gerou a formação do complexo alginato/quitosana que foi responsável pela redução dos poros das microcápsulas. Como já mencionado, microcápsulas em matriz alginato, não reforçadas pela quitosana, tem provavelmente uma densidade insuficiente de ligações cruzadas para impedir a difusão das moléculas.

As microcápsulas constituídas das matrizes poliméricas apresentam certa permeabilidade, o que de fato foi constatada pela liberação de insulina ocorrida. A cristalinidade do material polimérico e a estrutura de poros podem determinar o controle dessa difusão. Além disso, pode ocorrer um

enfraquecimento das ligações entre os íons cálcio e carboxilas do alginato ou ainda, das aminas da quitosana com as carboxilas do alginato, gerando um enfraquecimento na estrutura da esfera. O comportamento das microcápsulas contendo diferentes concentrações de insulina em matriz alginato/quitosana foi estudado em água destilada e em solução de cloreto de cálcio 2%. Na Figura 30 é possível analisar a liberação de insulina em água destilada. Ainda que as concentrações de insulina nas microcápsulas variem de 25 a 56%, não é verificada nenhuma diferença significativa no comportamento da saída da proteína das matrizes. Há uma liberação gradual da insulina tal qual observado na Figura 28 atingindo aproximadamente 30% de insulina liberada em 800 horas de ensaio. Embora outros pesquisadores tenham afirmado que a concentração de biomoléculas encapsuladas em alginato/quitosana influencie sua liberação, isto não foi confirmado para as condições avaliadas nesta invenção.

A Figura 31 exibe o comportamento em solução de cloreto de cálcio 2% das microcápsulas contendo de 31 a 73% de insulina. Semelhantemente ao ensaio anterior, não é observada uma diferença significativa no perfil de liberação de insulina das diferentes amostras. Em princípio, não há nenhum padrão de comportamento que possa estar relacionado com a microcápsula mais ou menos carregada de insulina. A quantidade de proteína liberada das microcápsulas em 700 horas de ensaio ficou na faixa de 20 a 30% do total. O efeito de retardamento da liberação de insulina pelos íons cálcio não ocorreu, e as microcápsulas, seja em água ou em solução de cloreto de cálcio, permitiram o mesmo perfil na liberação da proteína.

Inicialmente era esperado que o aumento da força iônica pela presença de íons cálcio influenciasse a saída de insulina das microcápsulas. Acreditava-se que os íons cálcio fizessem uma pressão nas esferas de alginato, fazendo que elas retivessem a proteína por mais tempo. Entretanto, foi observado que as microcápsulas em solução de cloreto de cálcio liberaram aproximadamente a mesma quantidade de insulina que em meio de água destilada.

As microcápsulas, após tratamento para produção de nanopartículas magnéticas, se apresentaram mais porosas e frágeis, permitindo uma liberação inicial de insulina maior que as microcápsulas que não passaram por este processo. Inclusive, as microcápsulas que a princípio eram esféricas se tornaram mais deformadas. A Figura 32 mostra o perfil de saída da insulina das microcápsulas contendo nanopartículas de óxido de ferro cuja matriz consistiu de alginato/quitosana.

As microcápsulas contendo nanopartículas magnéticas apresentaram um perfil de liberação similar ao das microcápsulas em matriz alginato/quitosana sem as nanopartículas. Com isso, constata-se que a etapa da produção destas nanopartículas não influencia significativamente a morfologia da microcápsula que possa alterar a liberação de insulina.

Os versados na arte valorizarão os conhecimentos aqui apresentados e poderão reproduzir a invenção nas modalidades apresentadas e em outras variantes, abrangidos no escopo das reivindicações anexas.

Reivindicações

PROCESSO PARA PRODUÇÃO DE MICROCAPSULAS DOTADAS DE PROPRIEDADES MAGNÉTICAS, PRODUTO OBTIDO E MÉTODO PARA A LIBERAÇÃO CONTROLADA DE SUBSTÂNCIAS ATIVAS

5

1. Processo para a produção de microcapsulas dotadas de propriedades magnéticas caracterizado por compreender a síntese *in situ* de partículas com propriedades magnéticas com dimensões nanométricas em uma rede polimérica, de forma que tais partículas fiquem incorporadas à referida rede.

10

2. Processo, conforme reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a referida rede polimérica compreende alginato.

3. Processo, conforme reivindicação 1 ou 2, caracterizado pelo fato de que a referida rede polimérica é preparada pelo gotejamento de solução de alginato de sódio 3% em solução de aquosa de cloreto de cálcio.

15

4. Processo, conforme reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que as referidas partículas com propriedades magnéticas compreendem óxidos de ferro.

5. Processo, conforme reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a síntese das referidas partículas nanométricas com propriedades magnéticas se baseia na coprecipitação de óxidos de Fe^{3+} e óxido de Fe^{2+} em condições controladas de temperatura e pH.

20

6. Processo, conforme reivindicação 1, 2 e 3 caracterizado pelo fato de que a síntese das referidas partículas com dimensões nanométricas e propriedades magnéticas é realizada no interior da estrutura do polímero.

25

7. Processo, conforme qualquer reivindicação anterior, caracterizado pelo fato de adicionalmente compreender a adição de substâncias adjuvantes para aumentar a capacidade de aprisionamento da substância ativa à matriz polimérica da microcapsula.

30

8. Processo, conforme reivindicação 7, caracterizado pelo fato de que o referido adjuvante é quitosana.

9. Processo, conforme qualquer reivindicação anterior, caracterizado pelo fato de adicionalmente compreender a adição de uma substância ativa.
10. Processo, conforme reivindicação 9, caracterizado pelo fato de que a referida substância ativa é um fármaco.
- 5 11. Processo, conforme reivindicação 10, caracterizado pelo fato de que o referido fármaco é a insulina ou qualquer sub-parte ou análogo funcional da mesma.
12. Processo, conforme reivindicação 9, caracterizado pelo fato de que a referida substância ativa é um catalisador.
- 10 13. Produto polimérico dotado de propriedades magnéticas caracterizado pelo fato de compreender uma rede polimérica contendo partículas com propriedades magnéticas com dimensões nanométricas, sendo tais partículas estruturadas na referida rede.
14. Produto, conforme reivindicação 13, caracterizado pelo fato de que a referida rede polimérica compreende alginato.
- 15 15. Produto, conforme reivindicação 13, caracterizado pelo fato de que as referidas partículas com propriedades magnéticas compreendem óxidos de ferro.
16. Produto, conforme reivindicações 13-15, caracterizado pelo fato de adicionalmente compreender substâncias adjuvantes que aumentam a capacidade de aprisionamento da substância ativa à matriz polimérica da microcápsula.
- 20 17. Produto, conforme reivindicação 16, caracterizado pelo fato de que o referido adjuvante é quitosana.
- 25 18. Produto, conforme reivindicações 13-17, caracterizado pelo fato de adicionalmente compreender uma substância ativa.
19. Produto, conforme reivindicação 18, caracterizado pelo fato de que a referida substância ativa é um fármaco.
20. Produto, conforme reivindicação 19, caracterizado pelo fato de que o referido fármaco é a insulina ou qualquer sub-parte ou análogo funcional da mesma.
- 30

21. Produto, conforme reivindicação 18, caracterizado pelo fato de que a referida substância ativa é um catalisador.
22. Método de liberação controlada de substâncias ativas caracterizado por compreender a aplicação de campo magnético oscilante a uma rede polimérica contendo partículas com propriedades magnéticas com dimensões nanométricas, tais partículas sendo estruturadas na referida rede.
23. Método, conforme reivindicação 22, caracterizado pelo fato de que a referida substância ativa é um fármaco.
24. Método, conforme reivindicação 23, caracterizado pelo fato de que o referido fármaco é a insulina ou qualquer sub-parte ou análogo funcional da mesma.
25. Método, conforme reivindicação 21, caracterizado pelo fato de que a referida substância ativa é um catalisador.

Figuras

Figura 1

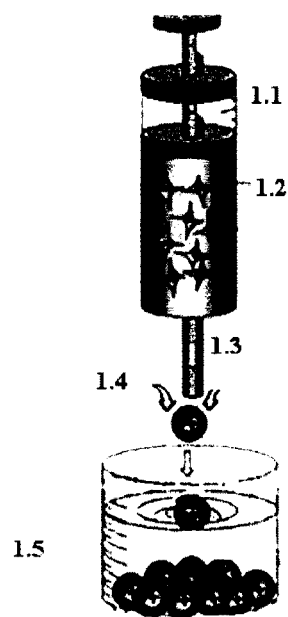


Figura 2

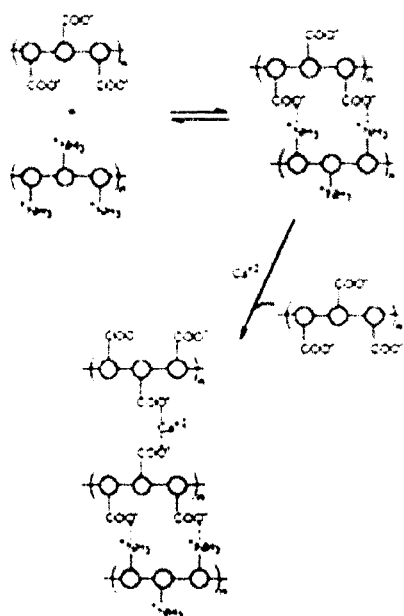


Figura 3

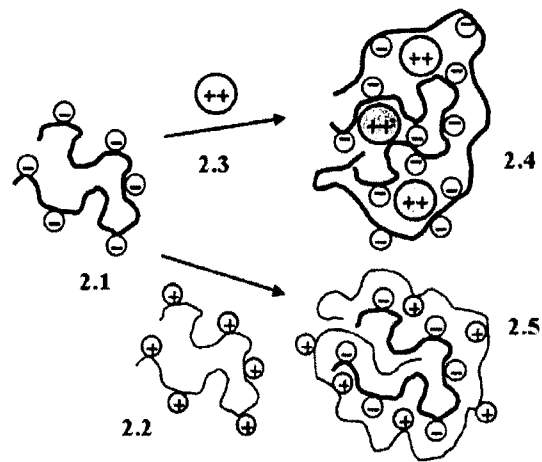


Figura 4

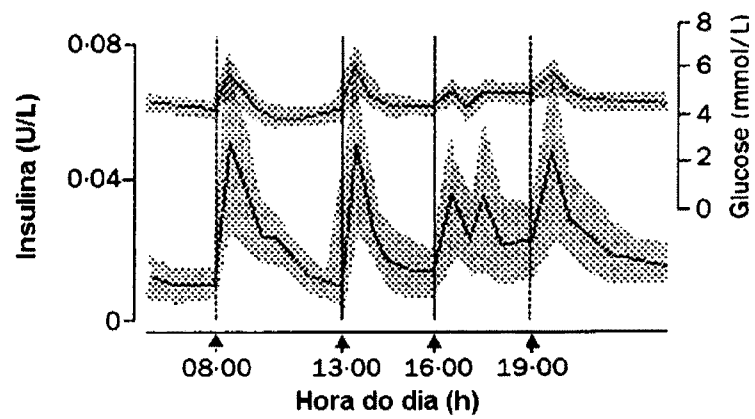


Figura 5

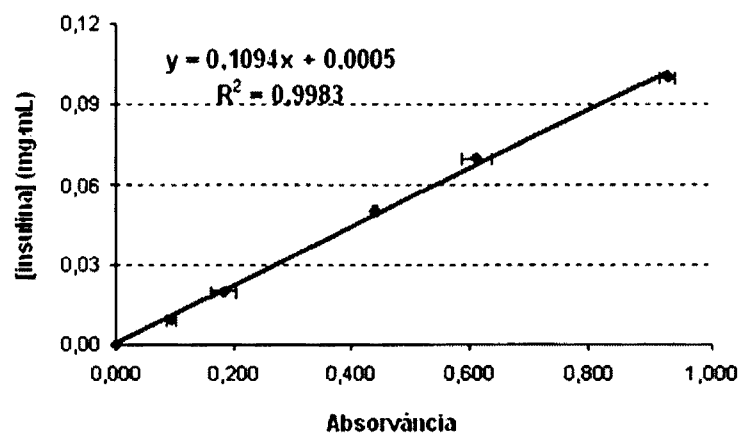


Figura 6

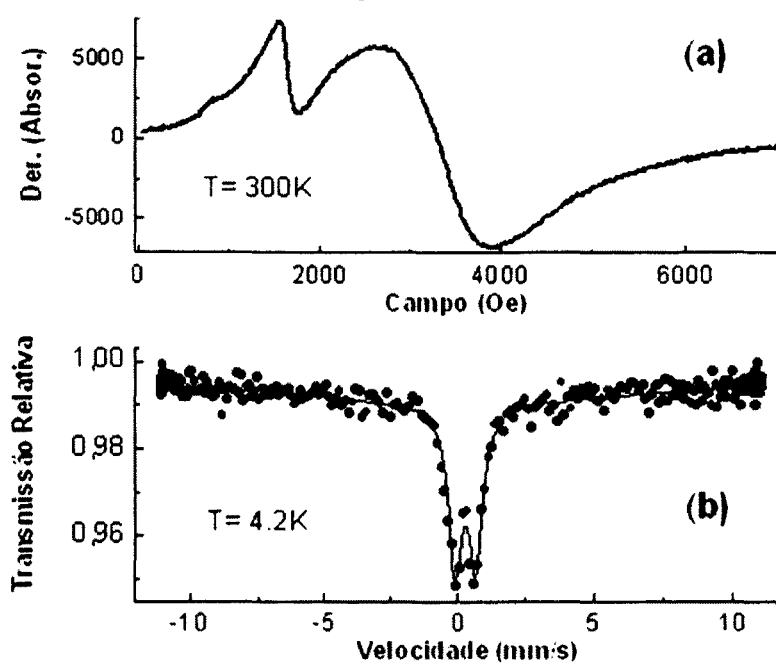


Figura 7

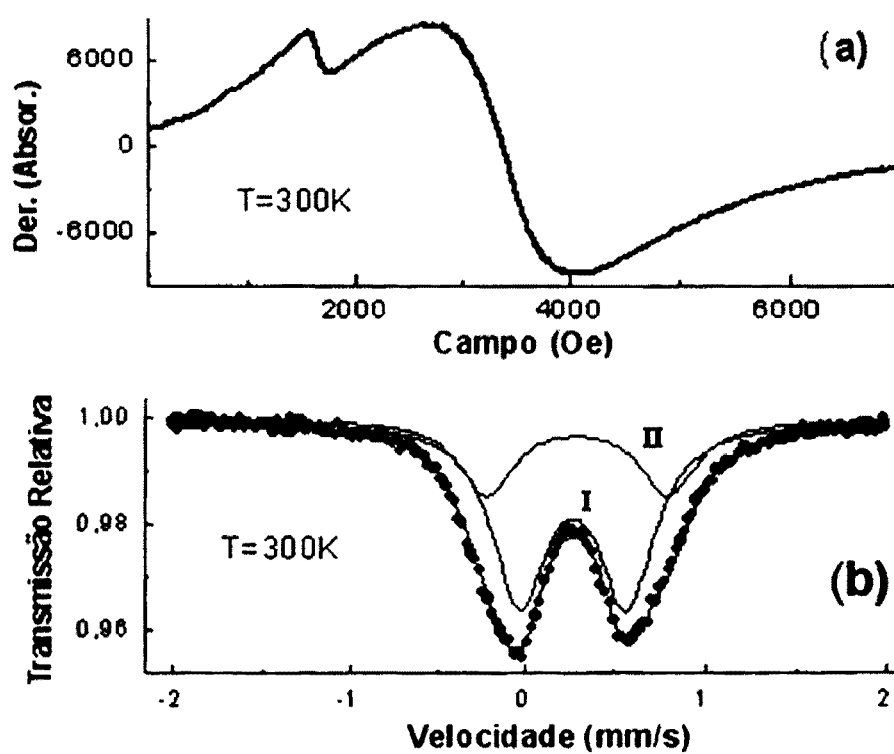


Figura 8

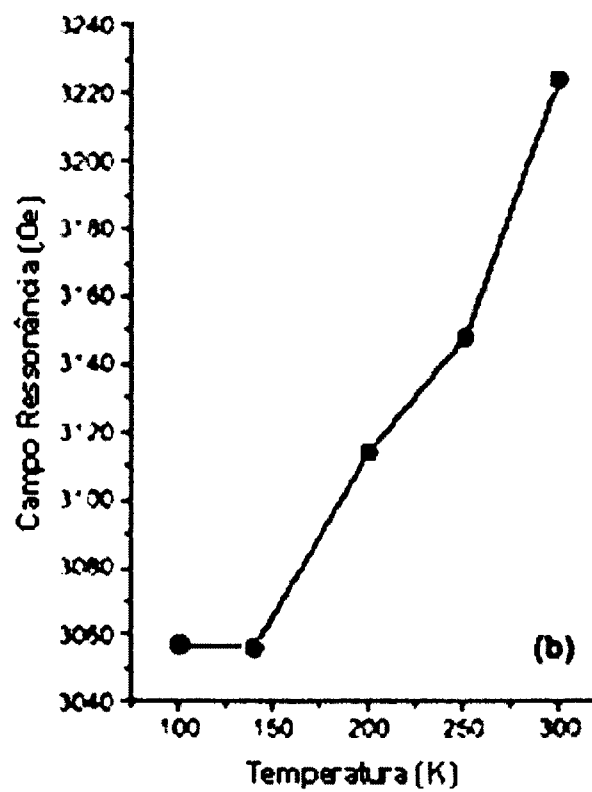
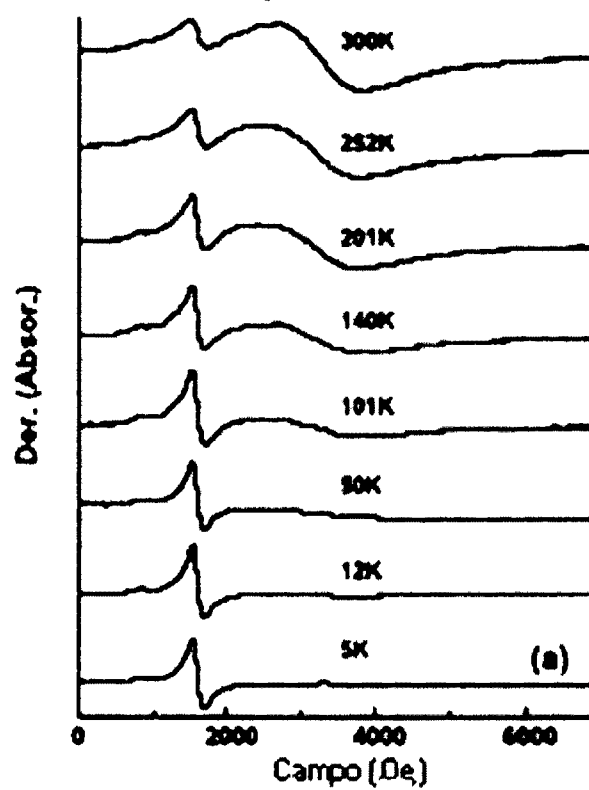


Figura 9

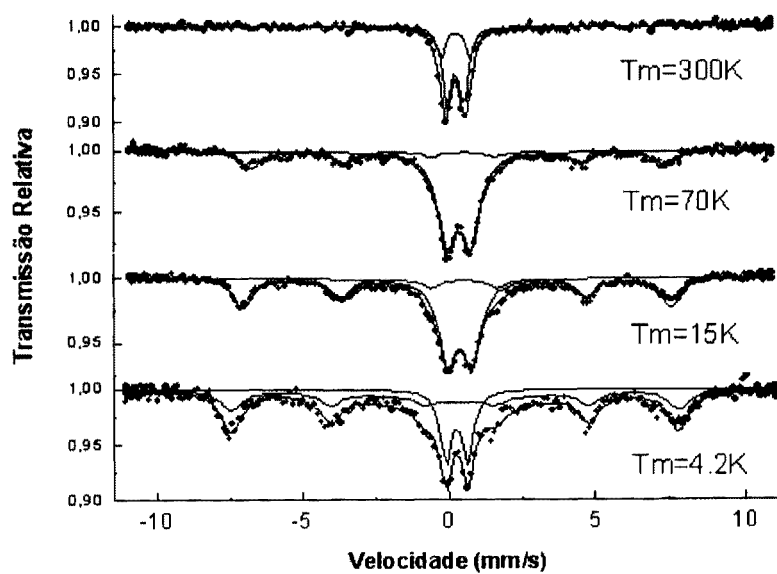


Figura 10

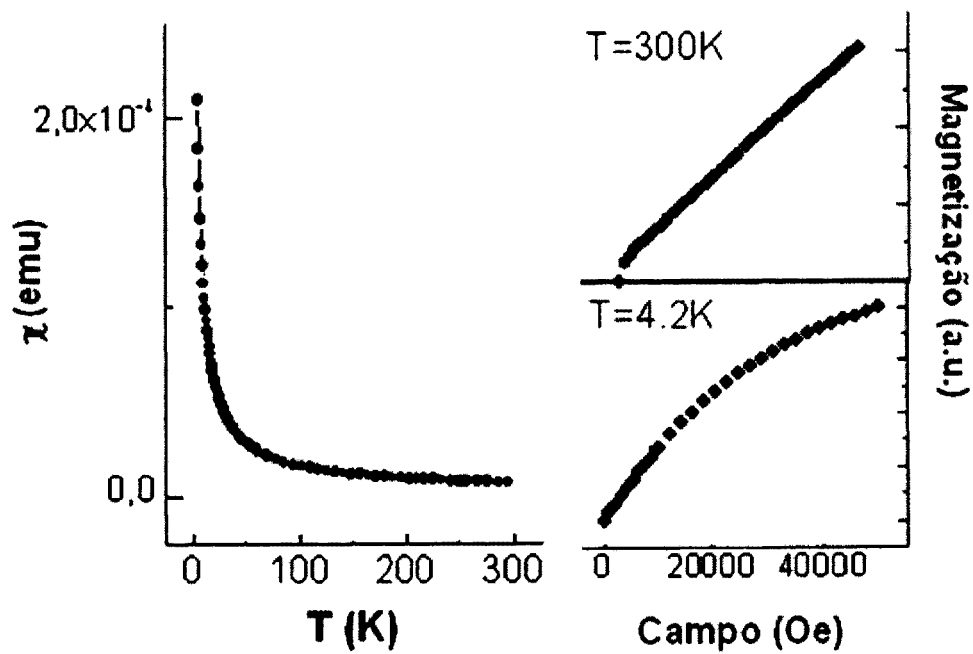


Figura 11

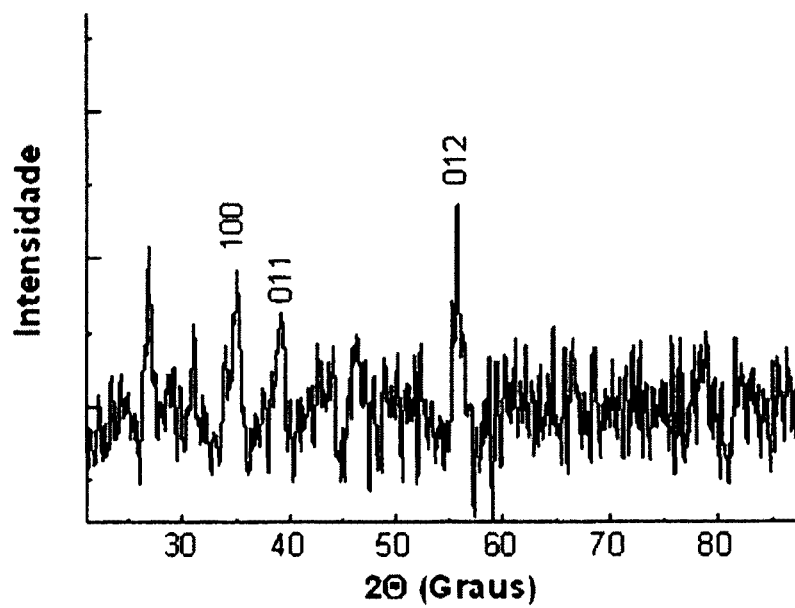


Figura 12

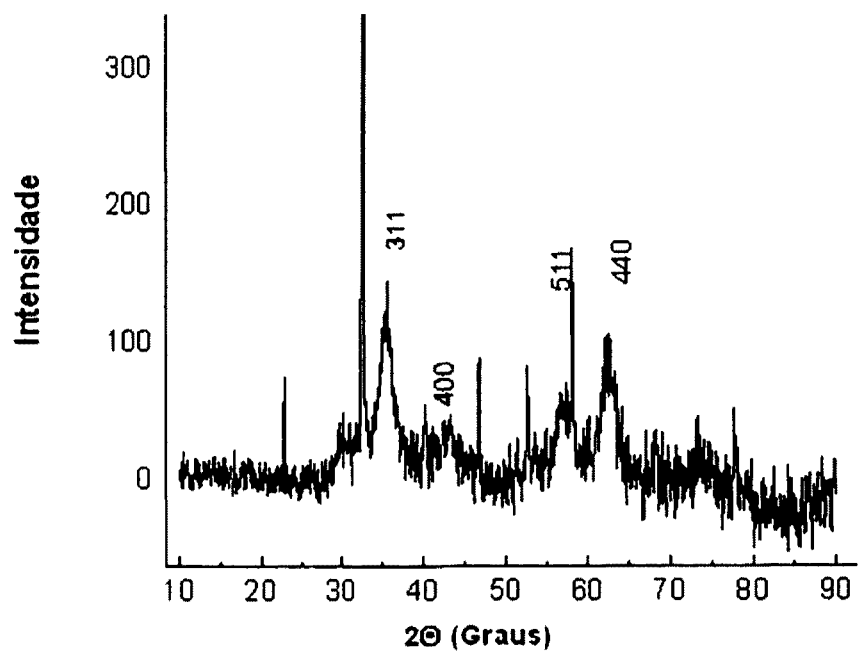


Figura 13

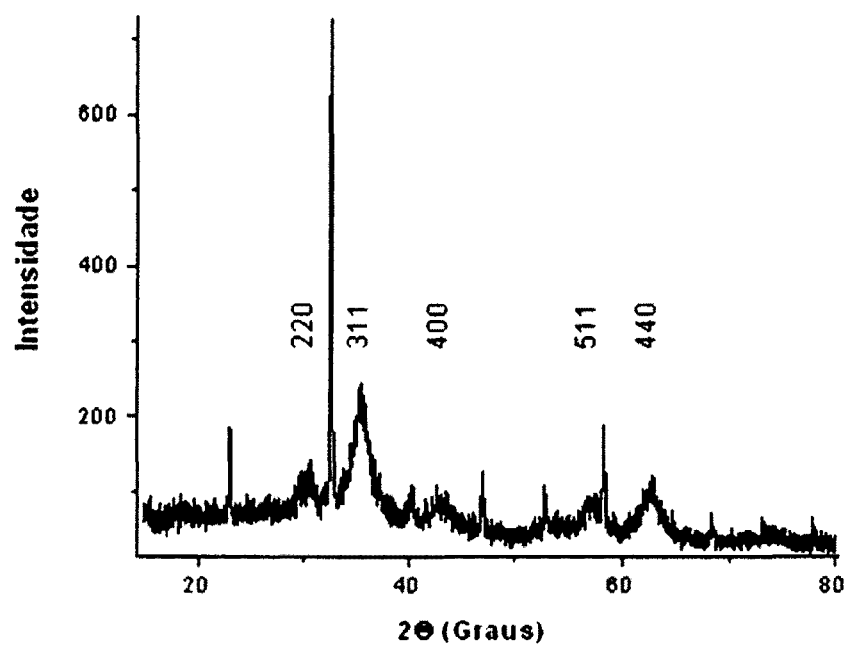


Figura 14

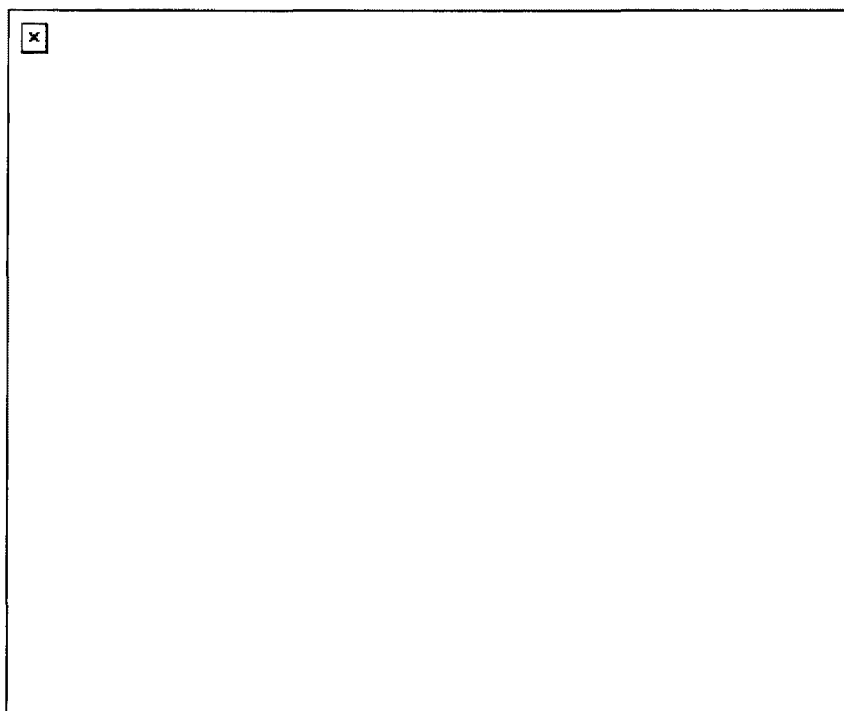


Figura 15

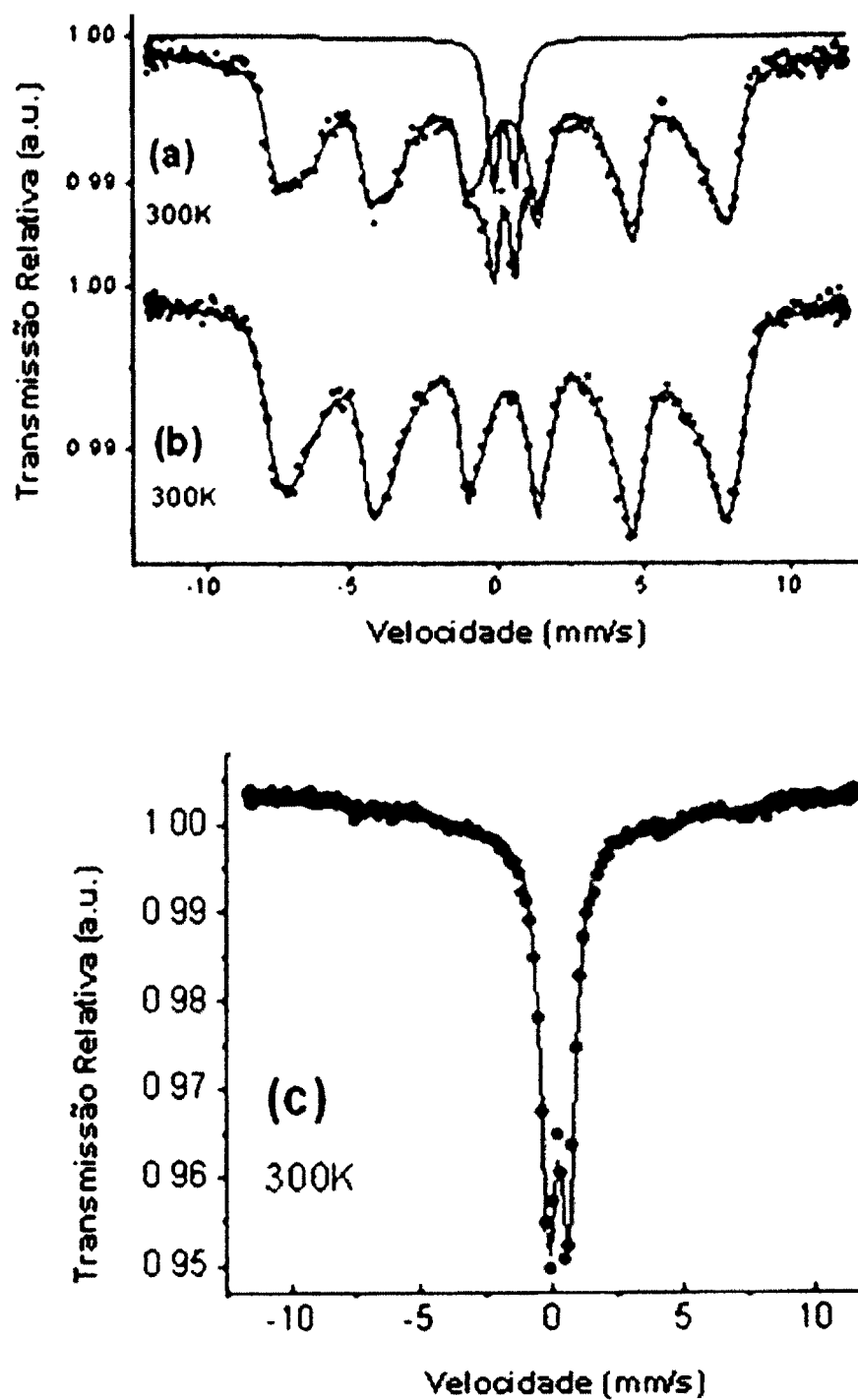


Figura 16

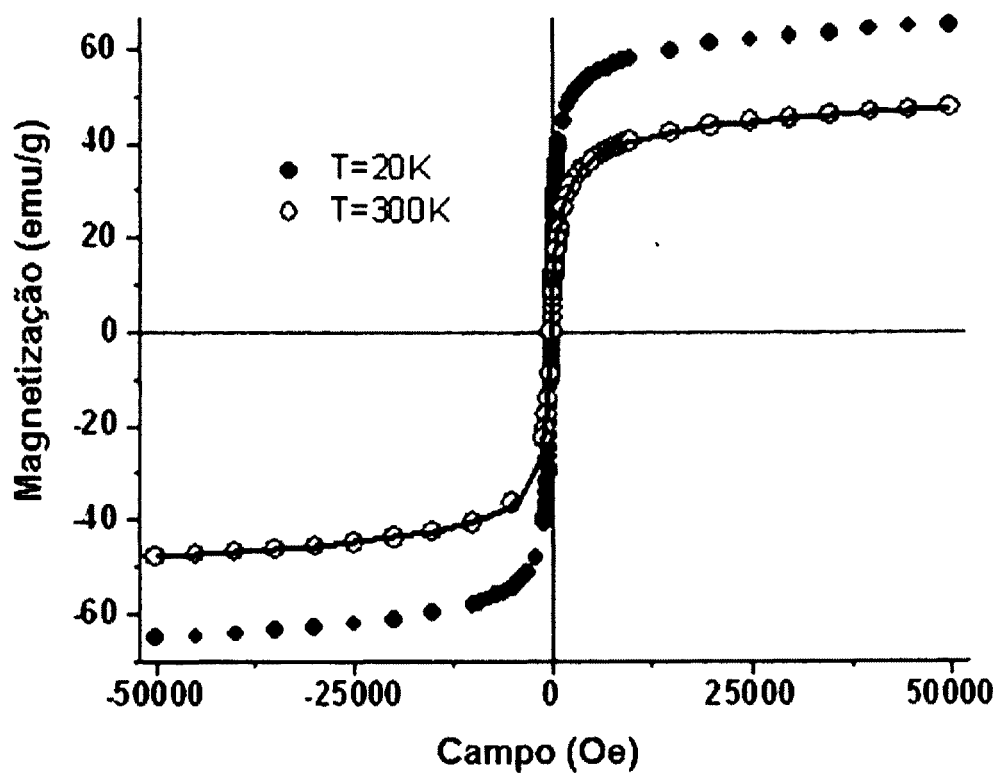


Figura 17

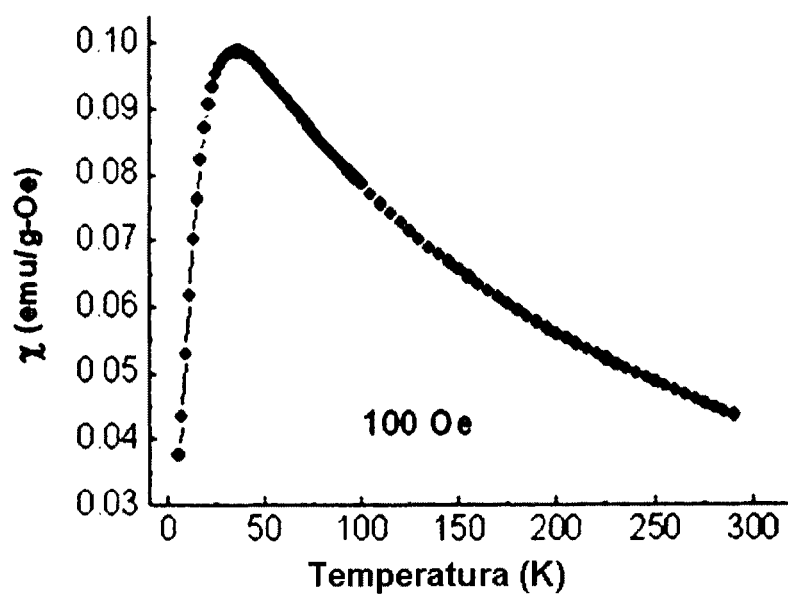


Figura 18

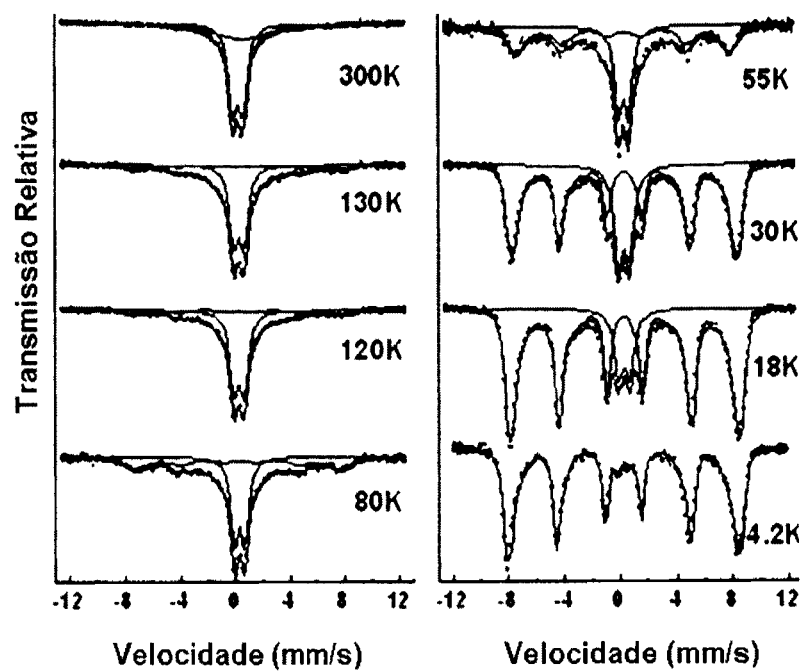


Figura 19

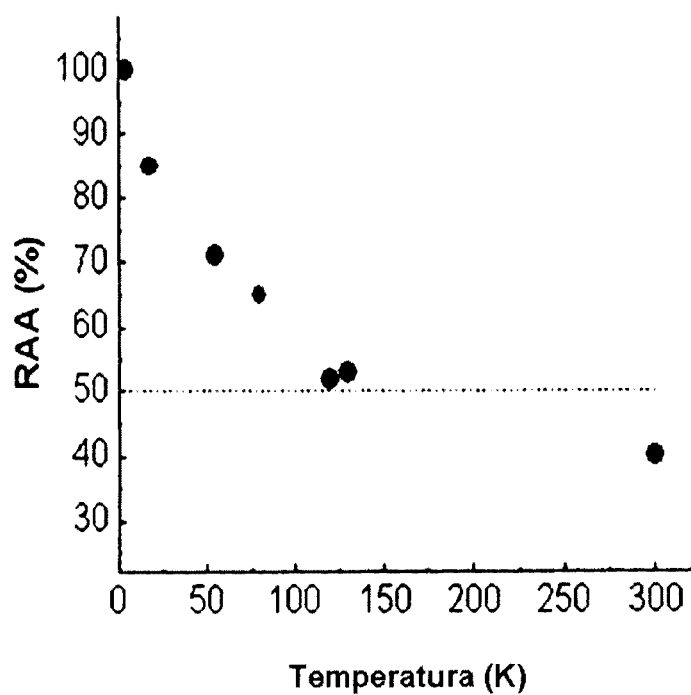


Figura 20

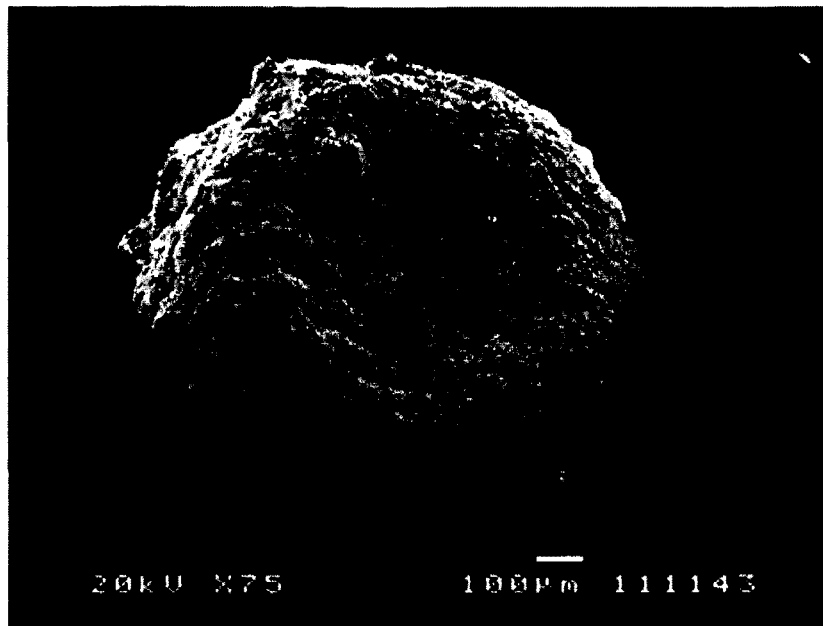


Figura 21

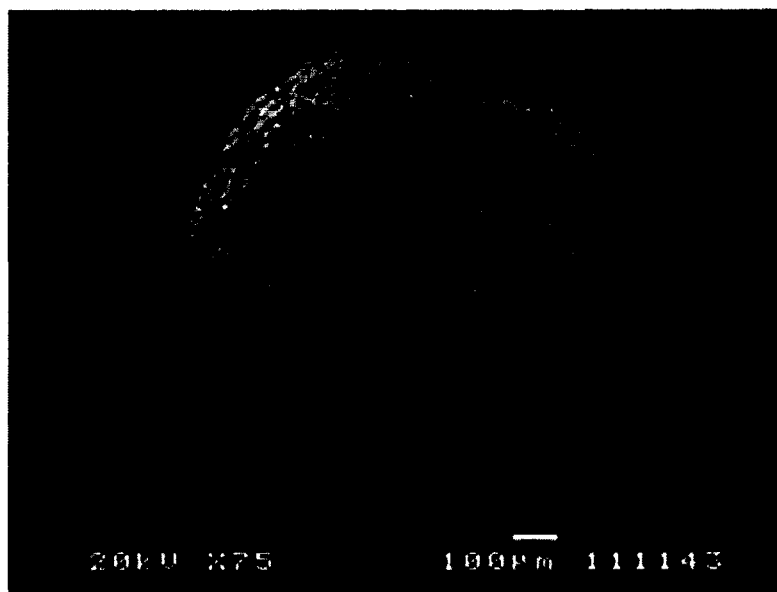


Figura 22

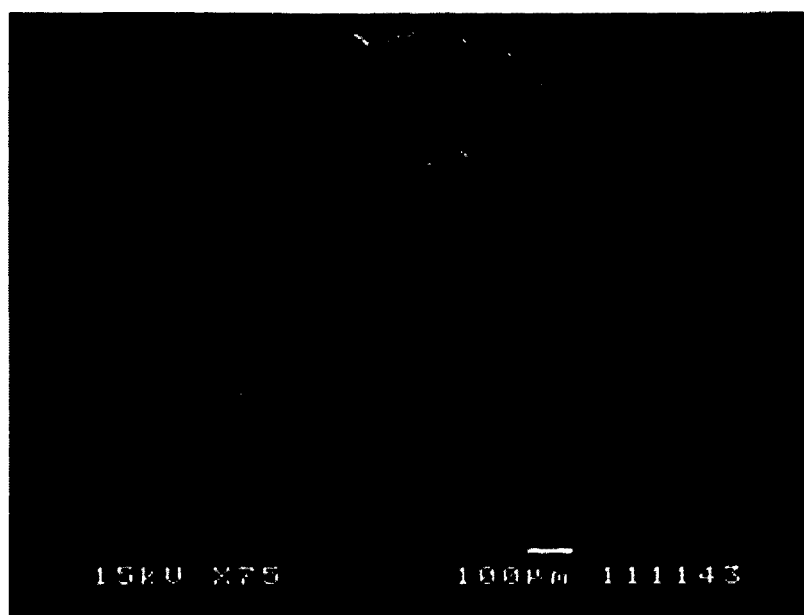


Figura 23

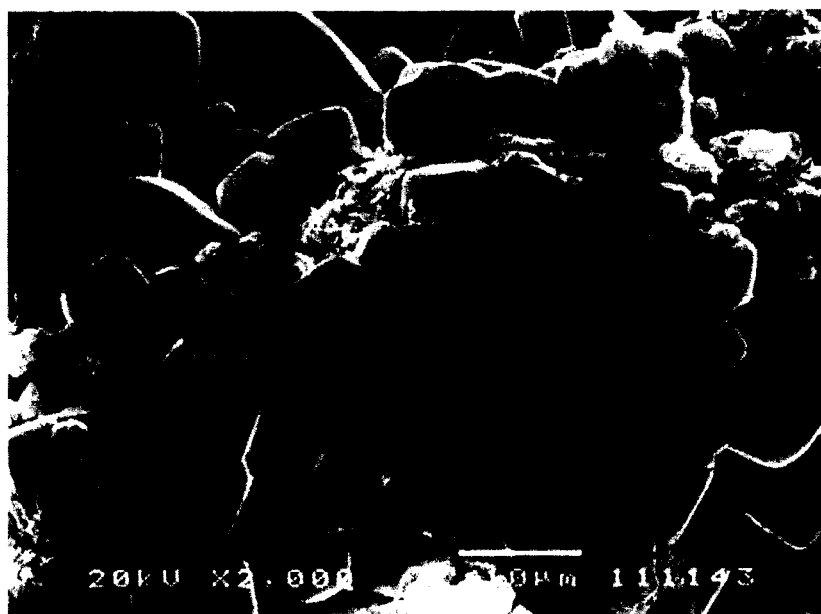


Figura 24



Figura 25



Figura 26

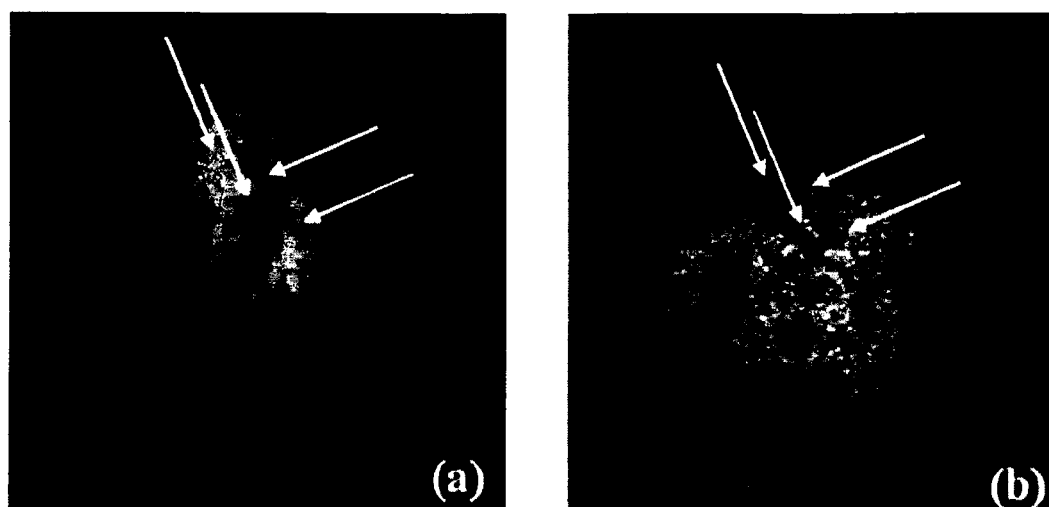


Figura 27

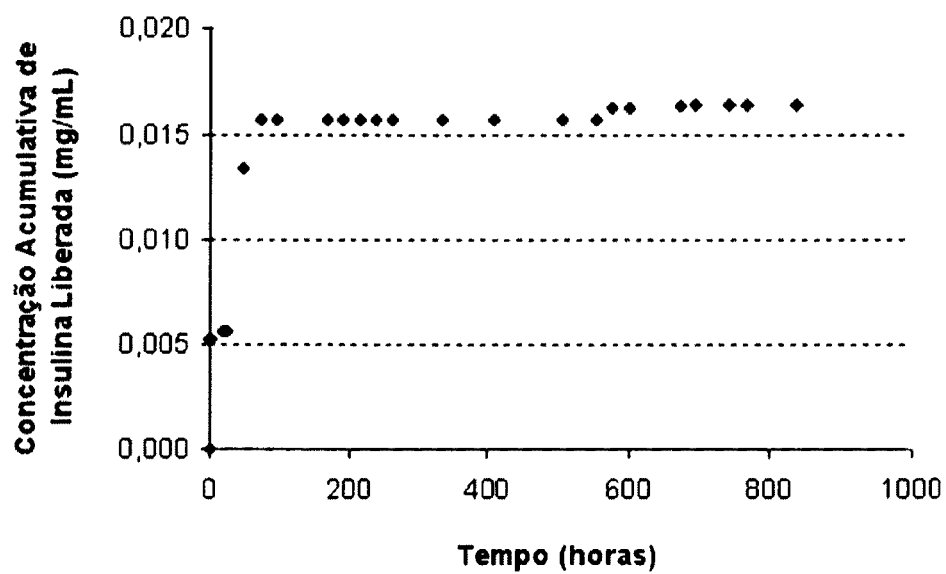


Figura 28

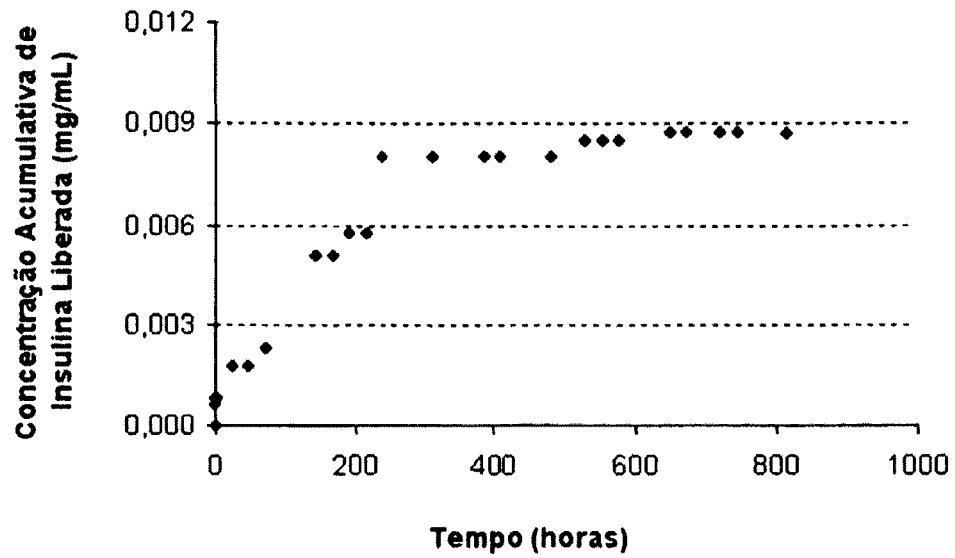


Figura 29

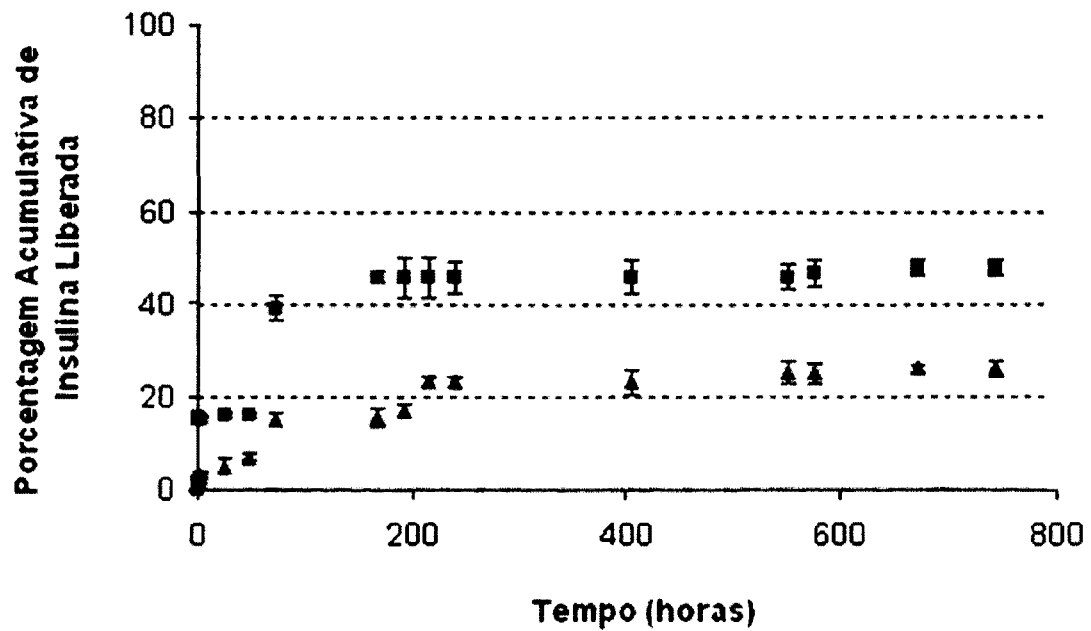


Figura 30

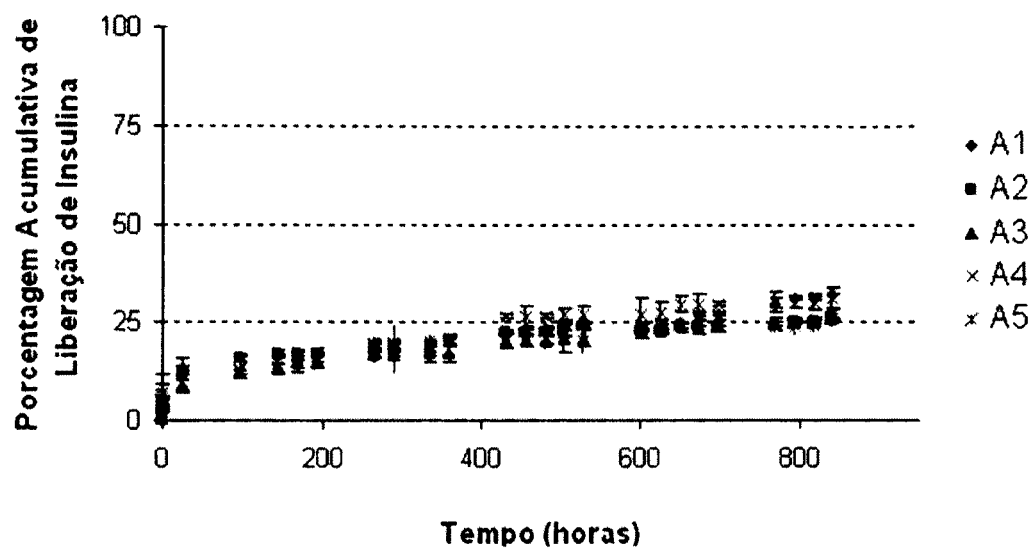


Figura 31

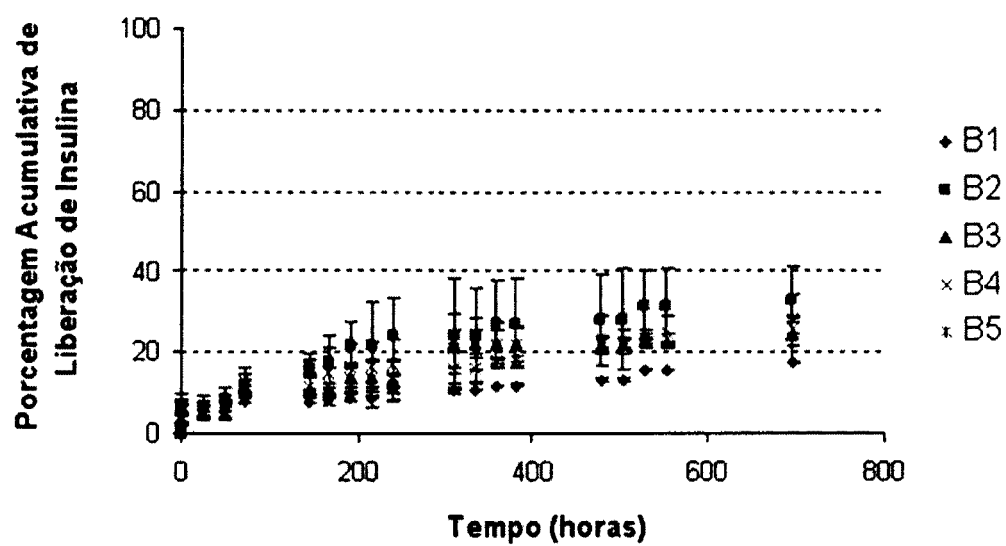
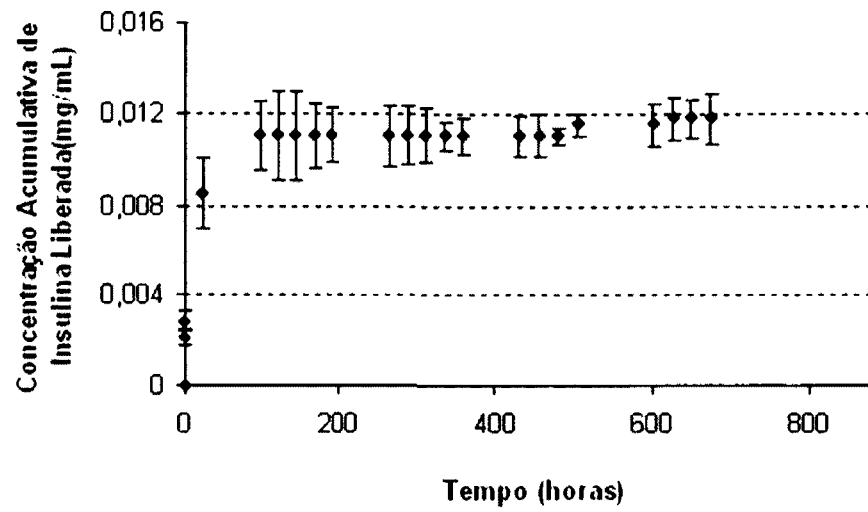


Figura 32



Resumo

PROCESSO PARA PRODUÇÃO DE MICROCÁPSULAS DOTADAS DE
PROPRIEDADES MAGNÉTICAS, PRODUTO OBTIDO E MÉTODO PARA A
LIBERAÇÃO CONTROLADA DE SUBSTÂNCIAS ATIVAS

5

10

A presente invenção descreve um processo de produção de microcápsulas contendo nanopartículas magnéticas para liberação controlada de substâncias ativas, bem como produtos relacionados a esse processo e métodos de liberação controlada de substâncias ativas a partir da aplicação de campo magnético oscilante. Em uma concretização preferencial, a síntese das nanopartículas é realizada *in situ*, na presença de alginato e quitosana, incorporando as propriedades magnéticas às microcápsulas. A liberação controlada de substâncias ativas como, por exemplo, a insulina, se dá por aplicação de campo magnético oscilante.